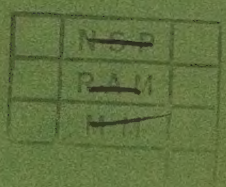
biologia plantarum

ACADEMIA SCIENTIARUM BOHEMOSLOVENICA

TOMUS II
1

PRAHA 1960



biologia plantarum

Časopis pro experimentální botaniku
Journal for Experimental Botany
Журнал экспериментальной ботаники
Zeitschrift für experimentelle Botanik

Hlavní redaktor akademik B. Němec

Redakční rada: C. Blattný, člen korespondent ČSAV, J. Brčák, I. Cetl, A. Činčerová, I. Hršel, K. Hrubý, J. Kloz, M. Luxová, akademik S. Prát, V. Rypáček, B. Slavík, výkonný redaktor, M. Sosna

Za překlady zodpovídají: G. Färber, Z. Landa, A. Ridesová, J. B. Rodendorfová, M. Vilbrová

Editor-in-Chief: B. Němec, Member of the Czechoslovak Academy of Sciences

Editorial Board: C. Blattný, Corresponding Member of the Czechoslovak Academy of Sciences, J. Brčák, I. Cetl, A. Činčerová, I. Hršel, K. Hrubý, J. Kloz, M. Luxová, S. Prát, Member of the Czechoslovak Academy of Sciences, V. Rypáček, B. Slavík, Editorial Secretary, M. Sosna

Foreign Language Editors: G. Färber, Z. Landa, A. Ridesová, J. B. Rodendorfová, M. Vilbrová

Главный редактор академик Б. Немец

Редакционный совет: член-корреспондент ЧСАН Ц. Блаттны, Я. Брчак, И. Гршел, К. Грубы, И. Клоз, М. Луксова, академик С. Прат, В. Рыпачек, Б. Славик, ответственный редактор, М. Сосна И. Цетл, А. Чинчерова

Переводы на иностранные языки: М. Вильброва, З. Ланда, А. Ридесова, Е. Б. Роденлорф, Г. Фербер

Hauptredakteur: B. Němec, Mitglied der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften

Redaktionsrat: C. Blattný, Korrespondierendes Mitglied der Tschsl. Akademie d. Wissenschaften, J. Brčák, I. Cetl, A. Činčerová, I. Hršel, K. Hrubý, J. Kloz, M. Luxová, S. Prát, Mitglied der Tschsl. Akademie d. Wissenschaften, V. Rypáček, B. Slavík, Redaktionssekretär, M. Sosna

Redaktion der fremdsprachigen Übertragungen: G. Färber, Z. Landa, A. Ridesová, J. B. Rodendorfová, M. Vilbrová

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

2 (1) : 1—18, 1960

The Heritability of the Amylolytic Activity in Barley

JOSEF NEČAS

Genetics Section of the Department of Plant Physiology, Microbiology and Genetics, Charles University, Praha

Received April 25, 1959

Souhrn

V předložené práci byla studována dědičnost β- i α-amylasových aktivit ječmene.

1. Potvrdilo se, že aktivita β-amylasy je u ječmene dědičně založena a vykazuje v jednotlivých letech pro příslušnou odrůdu charakteristické hodnoty. Vliv měnících se vnějších podmínek na projev znaku v jednotlivých letech je značný. Individuální variabilita znaku má v souborech normální rozdělení. V F_1 generaci z křížení odrůd o geneticky různé aktivitě má zpravidla přibližně intermediární charakter s mírnou převahou vyšší aktivity. Reciproká křížení nejsou shodná a projevuje se tu průkazný vliv mateřské odrůdy. Mezi velikostí zrna a aktivitou β-amylasy je negativní korelace.

2. Aktivita α-amylasy je rovněž dědičně založena. Jednotlivé odrůdy po stejně dlouhé době klíčení vykazují za týchž podmínek různý stupeň aktivity. Také dynamika přírůstků α-amylasové aktivity během klíčení za stejných podmínek je u jednotlivých odrůd různá a je v positivní korelaci s energií klíčení. Tato vlastnost nemohla být pro zdlouhavou metodiku studována v hybridních souborech.

Summary

During investigation of amylase activities as continuously variable biochemical features it was found that they are very sensitive to changes in the intensity of vegetative factors. The results of analysis of variance indicate that these characters not only tend to be inheritable themselves, but also the nature and intensity of their reactions to changes in the agro-ecological factors of the external environment show a similar tendency. The actual expression of these features in individuals belonging to a genetically homogeneous group

must be considered as the resultant of all reactions of the realisation process concerned, on stimulatory and inhibitory influences, both internal and external. For the genetical analysis of hybrid groups it is necessary to have the most complete picture possible of this continuous modificability which masks the actual genetical variability.

The results obtained in the present investigation provide evidence of complicated relations involved in the hereditary nature and formation of the features under consideration. In further work on the later generations of reciprocal and back crosses it will be necessary to determine more exactly the relative participation of nuclear and plasmatic components both in the hereditary transmission and in the actual formation of these characters.

The present results, although they are only preliminary, confirm the correctness of the modern view in genetics that genetical analysis should be linked with physiological analysis.

Introduction

The amylolytic activity of barley has been studied by a number of authors, but for the most part they have devoted themselves to the technological aspects or to practical questions of improvement. Little attention has been paid as yet to explaining the inheritability of these characters, although their varietal differences have often been observed. The genetical approach to the problem of the production of malting barley of high standard as regards these properties has so far been limited for the most part to determination of the linkage groups and the possibility of selection according to other characters in later generations of hybrids. In view of the rather more difficult procedure required, less attention has been devoted so far to tracing the actual transmission of characters from the parent varieties to the hybrid offspring in earlier hybrid generations. An attempt to do this was made in the present work, but unfortunately, although the work promised to be long-term, it had to be ended at the F_1 generation, when genetical work was really in its first stages.

Material and Methods

Material. The original parent varieties were two varieties of two-rowed spring barley, which are classified as high-quality malting barleys — Stupický full-grain (St) and Dětenický hero (D), belonging to the botanical species *Hordeum distichon*, two forms of six-rowed spring barley of the four-rowed type, denoted in this paper as (SoI) — glumed, and (SoII) — naked, belonging to the botanical species *Hordeum vulgare* "form" *tetrastichon* and one six-rowed form of spring barley *Hordeum vulgare* var. *brachyurum* (Alef.) — (H).

For the sake of simplicity all the established forms will be referred to as varieties and will be denoted by the symbols given in brackets.

Methods. In both years the land chosen for sowing had been under one crop and was prepared in the autumn and spring according to the usual procedure adopted for barley. It was manured with compost and artifical fertilisers in medium doses in accordance with the norms for spring barley. The grain was sown in 10 × 10 cm. drills to a depth of 3·5—4·0 cm. The crop was then left until the harvest without watering or other cultivation. Harvesting was manual, single plants being taken for individual analyses and the whole of each replication for average samples.

In 1955 crossing was carried out in combinations as follows:

Combinations of crosses	D × H	H × D	D × SoI	SoI × D	D × SoII	SoII × D
No. harvested plants in F_1	39	81	28	39	86	74
Combinations of crosses	St × H	H × St	St × SoI	SoI × St	St × SoII	SoII × St
No. harvested plants in F_1	62	107	49	30	44	121
Combinations of crosses	H × SoI	SoI × H	H ×	SoII	SoII × H	
No. harvested plants in F_1	52	9	51		38	

Determination of total β-amylase activity. The method worked out by KASTNER and JANÁČEK (1956) was used. It was worked out on the basis of SANDEGREN and KLANG's (1950) method for the preparation of barley extracts with total β-amylase and WINDISCH and KOLBACH's method (according to PAWLOWSKI and DOEMENS 1938) for iodometric determination of increases in reduction power in a solution of starch paste by amylase action. For the present purpose and under the given laboratory conditions it was necessary to modify the method in certain respects both for analyses of average samples from the different varieties and for the determination of individual variability in the varieties.

Some of the changes were experimentally confirmed and some were carried out on the basis of convincing published data.

A buffer solution (0·3 M Na_2HPO_4 and 0·15 M citric acid) was used for extraction, because a freshly prepared solution of basic cystein in HCl could not be neutralised to the pH of the extraction solution in view of the fact that the stability of cystein is too low at this pH. The necessary optimal pH was adjusted after the addition of the extraction solution.

Although lengthy and demanding much care, the preparation of cystein base on each occasion before use has certain advantages as compared with the preparation of cysteinhydrochloride. Cystein base can be better stored, because it is less hygroscopic and is not so liable to be spoilt by oxidation to cystin.

In further elaboration of the method in an adequately equipped laboratory it will be necessary to follow the stability of the redox potential of the extraction mixture in the same way as KASTNER and JANÁČEK (1956) followed the stability of its pH during the whole process of extraction. During rapid extraction the mixture is continually disturbed and its surface is continually in contact with the air.

The experiment with increasing cystein doses showed that greater activity was not achieved.

Table 1. Empirical determination of the effectiveness of the cystein used

Without cystein	Normal dose 0·35 g./10 g.	11/2 norm. dose	2 norm. dose
83·89	133·73	133·85	108·56

The values are given in activity units and are averages of four repetitions.

The double dose reduced activity by producing over-acidity of the extraction mixture. The other data show that a sufficient quantity of cystein is definitely maintained in active form throughout the period of extraction.

Natural potato starch had to be used as substrate because soluble starch was unobtainable at the time. Lower values are obtained with natural starch than with the soluble. For later comparison six repetitions of comparative determination of activity were carried out with

the same sample both with natural starch (average 142·89 activity units) and soluble starch "Lachema" (average 187·41 activity units).

The pH of the substrate was adjusted to 5·0—5·2 with acetate buffer. MYRBÄCK and MYRBÄCK (1933) demonstrated that this pH is really the optimum for β-amylase and that at a pH of 4·3, which is used in technological analyses, only 80% of true activity is achieved. MYRBÄCK and NEUMÜLLER (1951) also mention pH of 5·0 to 5·2 as optimal. A lower pH is sometimes justified in that it causes the inactivation of accompanying α-amylase. Published work supports the fact, confirmed also in the present work, that this amylase is present only in traces in ungerminated barley.

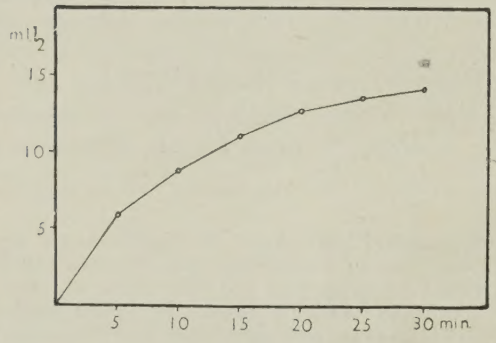


Fig. 1. Influence of the time factor on β-amylolytic reaction rate of barley extract. Abscissa: reaction time in minutes ordinate: consumption of iodine solution in ml.

The duration of the saccharising reaction was shortened to 15 minutes, because fig. 1, which shows the dependence of β-amylolytic activity on the reaction time under given conditions, shows clearly that this phase of the reaction curve is the most suitable for comparison of the different samples. Saccharisation took place at a temperature of 25° C.

In order to express the activity of total β-amylase in the different barley samples units were used analogical to the activity units of Windisch and Kolbach (PAWLOVSKI and DOEMENS 1938), calculated according to the formula:

$$\text{Activity unit} = \frac{(A - B) \,.\, f \,.\, 0{\cdot}0171 \,.\, c \,.\, 100}{s}$$

A = consumption ml. 0·1 N $Na_2S_2O_3$ in control (blind experiment)
B = consumption ml. 0·1 N $Na_2S_2O_3$ in actual experiment
f = analytical factor 0·1 N $Na_2S_2O_3$
c = conversion factor for conversion of amount of extract used to equivalent of 100 g. barley
s = % dry weight
0·0171 = maltose equivalent of one millilitre 0·1 iodine in g.

The conversion factor "c" corresponds to the modifications in the method already mentioned and has no general validity. Thus it is not possible to compare directly the active units mentioned here with units obtained by another method. They are, however, mutually comparable, as shown by empirical checking of the method, which was carried out 24 times by repeated analysis of the same homogenised sample. All values were within the range 129·00—135·00 activity units when $\bar{x} = 131{\cdot}76$, $s_{\bar{x}} = 0{\cdot}17$ and $s_x = 0{\cdot}86$. Thus the reproducibility of the method when carried out as described above in serial application is good. The analysis of variance, the results of which are given in table 2, shows that a greater part is played in the total variability of values from repeated analyses of the same sample by differences between different series worked on concurrently than by differences within these series. This is understandable, for the whole analysis involves a number of operations and it cannot be expected that they will all be reproduced similarly in all details. The distribution of total variability, caused by the above method, made it possible to achieve a more reliable evaluation of the results of genetical analyses. (For a more detailed description of the method see NEČAS 1957.)

It is realised that a marked shortcoming has been the impossibility of carrying out a comparison with the method using papain in combination with cystein as activator. These results would be required for a further confirmation that the total quantity of β-amylase is really determined and also for throwing light on the question whether varietal differences in activity are in fact caused only by differences in β-amylase content or perhaps by differences in quality. Differences in proteases in the grain could also have their effect.

Table 2. Analysis of variance of repeated analyses of the same sample on the activity of β-amylase

Variability	N	$S(x—\bar{x})$	V	F	s
Between series	3	7·95	2·65	2·84	
Within series	5	3·85	0·77	0·83	
Uncontrolled influences	15	14·05	0·93		0·96
Total	23	25·85			

Determination of α-amylase activity. This determination was carried out only in average samples from the different varieties. The individual variability of this character could not be established, because the method used did not allow of this owing to its lengthiness and the difficulty of getting reproducible results. The method used was that of Blom and Bak (1938) adapted for measurement with Ostwald's viscosimeter under the given laboratory conditions. Determinations were made of the dynamics of increase in α-amylase activity during the germination of the different varieties and α-amylase activity following a 96-hour period of germination. (For a more detailed description of procedure see Nečas 1957.)

For the expression of α-amylase activities of the different samples of barley, activity units according to Blom and Bak (1938) were employed.

$$\text{Activity unit} = \frac{1000}{a \,.\, (t_2 - t_1)}$$

a = dry weight of barley to which the amount of lixivium used corresponds
t_1 = time in which the enzyme-hydrolysed starch paste had a viscosity corresponding to an outflow period of 0·90 min.
t_2 = time in which it had a viscosity corresponding to an outflow period of 0·40 min.

The values t_1 and t_2 were obtained by mathematical interpolation of the series of values measured.

The influence of differential thermal inactivity of α-amylase on the reduction in viscosity of the paste is shown in fig. 2. From this it is evident that the method is not sensitive enough to record this influence. It was therefore decided to neglect the differential thermal inactivity of the extracts during the serial analyses.

The increase in α-amylase activity during germination, indicated by curves of the reduction in starch paste viscosity, is recorded in fig. 3.

Two samples were taken for analysis from each of the tested barley plants and each sample was measured three times. In order to confirm whether the method is capable of registering varietal differences the analysis of variance was performed, the results being presented in table 3.

From the results of this analysis it is evident that varietal differences are recorded quite well by this method. The error of the method is higher than the error in the preparation of extracts.

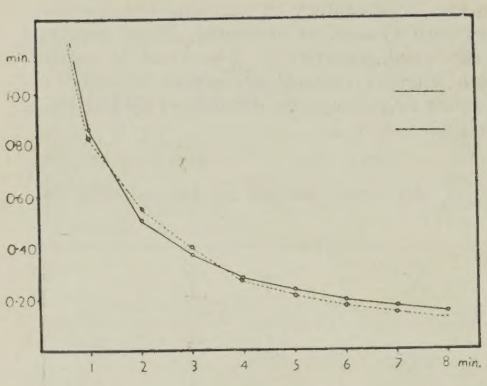


Fig. 2. Influence of differential thermal inactivation of β-amylase in barley extract on decrease in viscosity of starch paste. Continuous line: non-inactivated extract, broken line: inactivated extract. Abscissa: reaction time in minutes. Ordinate: period of flow of the reacting mixture through the viscosimeter in minutes.

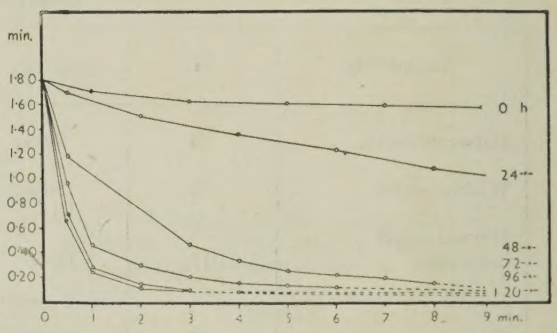
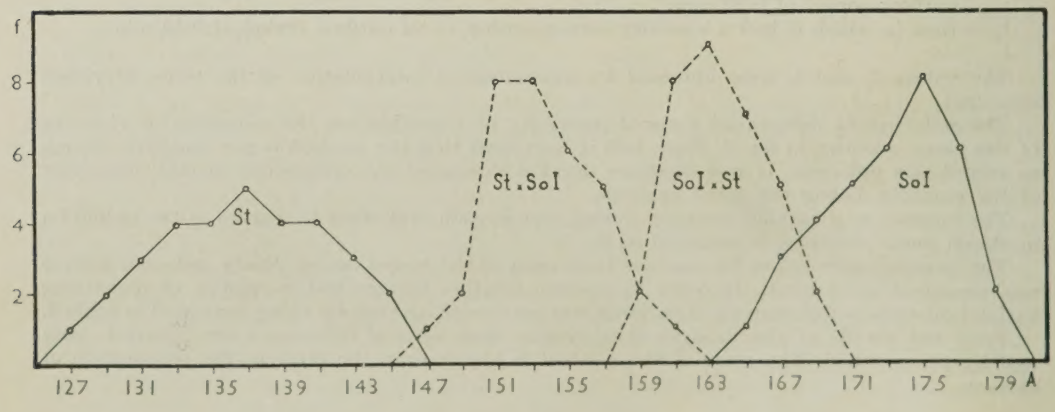


Fig. 3. Increases in α-amylase activity during germination. Abscissa: reaction time in minutes. Ordinate: period of flow of the reacting mixture through the viscosimeter in minutes.

Table 3. Analysis of variance of repeated analyses of average samples of the varieties under investigation

Variability caused	N	$S(x - \bar{x})^2$	V	F	s
by varieties	4	14,442,529·96	3,610,632·5	35·66++	
by parallel samples	1	30,715·62	30,715·6	0·30	
repeated analyses	2	335,999·56	167,999·8	1·65	
uncontrolled influences	22	2,227,289·82	101,245·0		318·19
Total	29	17,036,634·96			



Results

β-amylase activity

Table 4. Review of the average β-amylase activities of parent varieties in both years from sets of individuals

Variety	1955				1956			
	activity units				activity units			
	n	$\bar{x}$	$s_{\bar{s}}$	s_x	n	$\bar{x}$	$s_{\bar{s}}$	s_x
D	—	—	—	—	36	158·38	0·44	2·64
St	50	104·24	1·02	7·24	36	137·50	0,88	5·30
SoI	20	139·00	0·99	4·44	35	173·17	0·60	3·60
SoII	—	—	—	—	24	130·43	0·71	3·50
H	50	155·64	1·04	7·36	36	183·38	0·56	3·40

Table 5. Review of average β-amylase activities of parent varieties in 1955, converted to dry weight without glumes

Variety	D	St	SoI	SoII	H
Activity units	139·85	117·42	157·22	110·71	179·83
Order	3	4	2	5	1

Values for varieties D and SoII are taken from average samples.

Table 6. Review of average β-amylase activities of parent varieties in 1955, converted to dry weight of average 1,000 grains without glumes

Variety	D	St	SoI	SoII	H
Activity units	60·15	53·37	50·44	34·23	57·58
Order	1	3	4	5	2

Fig. 4. Variability of β-amylase activity in parent varieties and their F_1 generation. For an explanation of the marking of varieties and their crosses see text. Abscissa: activity units. Ordinate: frequency in different variation classes, converted to corresponding magnitudes of variation sets.

The empirical distribution curve of individual values for plants of variety St were tested for agreement with normal distribution by Kolmogorov-Smirnov's method (Myslivec 1957). The value of function λ was here 0·37 and P = 0·99. Thus, the individual variability of β-amylase activities in a set of individuals of the same variety is normally distributed and statistical methods for normal distribution can be used for the evaluation of the series.

Table 7. Analysis of variance of β-amylase activities of average samples of parent varieties in both years

Year	1955				1956			
Repl. / Var.	1	2	3	4	1	2	3	4
D	122·33	119·86	128·51	125·42	151·76	156·00	155·39	156·37
St	112·97	109·88	107·42	111·12	140·55	146·29	147·49	149·92
SoI	134·28	137·37	141·70	132·42	171·61	177·06	178·57	168·47
SoII	121·23	105·15	110·10	106·38	157·71	168·26	168·57	162·02
H	169·82	157·47	158·71	156·24	180·50	192·38	183·88	187·62

Variability caused by	N	$S(x - \bar{x})^2$	V	F	s
varieties	4	10,256·06	2,564·01	312·30++	
years	1	13,223·87	13,223·87	1,610·70++	
replications	3	37·22	12·40	1·51	
years × rep.	3	233·91	77·97	9·49++	
varieties × rep.	12	367·43	30·62	3·72+	
varieties × years	4	754·07	188·51	22·96++	
uncontrolled infl.	12	98·54	8·21		2·86
Total	39	24,971·10			

Analysis of variance in order makes it possible to delimit the interaction components of the variation of values obtained from analyses of F_1 generation and a picture was obtained of the stability of characters and the influence of some factors on their actual expression.

Table 8. Review of average β-amylase activities in F_1 generation

Combination	n	Activity units				Significance of differences in reciprocal crosses	Order	Conversion to dry weight of 1,000 grains		Order
		$\frac{P_1+P_2}{2}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	s_x			$\frac{P_1+P_2}{2}$	$\bar{x}$	
D × H	24	170·38	178·25	0·58	2·86	$P = 10^{-9}$	3	58·86	63·47	1
H × D	24		185·00	0·61	3·00		1		58·80	3
D × SoI	18	165·77	163·78	0·73	3·12	$P = 10^{-9}$	8	55·29	39·52	13
SoI × D	6		170·06	1·07	2·64		6		37·45	16
D × SoII	12	144·40	140·84	0·62	2·16	$P = 10^{-9}$	14	47·19	47·90	7
SoII × D	12		148·67	0·40	1·42		12		41·29	12
St × H	30	160·44	171·66	0·47	2·62	N	4	55·47	59·53	2
H × St	36		172·84	0·63	3·80		5		56·71	4
St × SoI	21	155·33	152·72	0·41	1·92	$P = 10^{-9}$	11	51·90	52·66	5
SoI × St	6		162·00	0·66	1·62		9		45·25	9
St × SoII	12	133·96	137·66	0·70	2·46	$P = 0·05$	16	43·80	49·43	6
SoII × St	12		140·00	0·73	2·56		15		46·66	8
H × SoI	15	174·40	184·53	0·56	2·20	$P = 10^{-9}$	2	54·01	43·31	11
SoI × H	4		164·30	0·57	1·14		7		37·94	15
H × SoII	14	151·59	155·85	0·65	2·44	$P = 10^{-9}$	10	45·90	45.00	10
SoII × H	12		147·33	0·63	2·22		13		39·20	14

Table 9. Intravarietal correlation coefficients of average grain size and average β-amylase activity

Variety	n	r	Fluctuation r	Significance
Varieties 1956				
D	24	—0·08	—	N
St	33	0·79	0·52—0·92	$P = 10^{-3}$
SoI	24	0·04	—	N
SoII	24	—0·04	—	N
H	33	0·33	—	N
F_1 generation 1956				
D × H	24	—0·37	—	N
H × D	24	—0·70	—0·23 až —0·91	$P = 10^{-3}$
D × SoI	18	—0·64	—	N
SoI × D	6	—0·39	—	N
D × SoII	12	—0·13	—	N
SoII × D	12	0·55	—	N
St × H	26	0·04	—	N
H × St	28	0·06	—	N
St × SoI	21	—0·03	—	N
SoI × St	6	—0·64	—	N
St × SoII	12	0·08	—	N
SoII × St	12	0·02	—	N
H × SoI	15	—0·16	—	N
H × SoII	12	0·17	—	N
SoII × H	12	—0·54	—	N

Table 10. Intervarietal correlation coefficients of average grain size (y) and average β-amylase activity (x)

Varieties (n = 5)	
r	—0·44
fluctuation r	—
significance	N
b xy	—
b yx	—

F_1 generation (n = 16)	
r	—0·64
fluctuation r	0·00 až —0·93
significance	$P < 0·05$
b xy	—2·63
b yx	—0·16

α-amylase activity

Table 11. Analysis of variance of α-amylase activities in average samples of varieties examined from five replications in 1955

Variety Paral. sample	D		St		SoI		SoII		H	
Repet.	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	3156	3298	3390	3330	2812	2739	5712	5924	3721	3851
2	2842	2867	2715	2707	2805	2690	5747	5870	4053	4416
3	2802	3015	2875	2969	2947	3096	5994	5912	4017	4428
4	3839	3739	3421	3287	2914	2943	5666	5643	4261	4258
5	3686	3822	3067	3140	2694	2693	5810	5910	3925	3860

Variability caused by	N	$S(x-\bar{x})^2$	V	F	s
varieties	4	58,261,900·98	14,565,475·24	225·57++	
replications	4	557,512·78	139,378·19	2·15	
parallel determinations	1	44,999·91	44,999·91	0·69	
uncontrolled influences	40	2,582,812·01	64,570·30		254·1
Total	49	61,447,225·68			

Table 12. Analysis of variation of average α-amylase activities of average samples from all replications with single varieties in both years.

Variety	D	St	SoI	SoII	H
1955	4615	3524	1238	4370	4175
1956	3243	2455	1989	3853	2518

Variability caused by	N	$S(x-\bar{x})^2$	V	F	s
varieties	4	7,980,016	1,972,504	4·36	
years	1	1,493,049	1,493,049	3·30	
uncontrolled influences	4	1,807,992	451,998		672·3
Total	9	11,191,057			

Table 13. Dynamics of increases in α-amylase activities during germination in both years

Hours germination		0		24		48		72		96		120
Year		1955	1956	1955	1956	1955	1956	1955	1956	1955	1956	1955
Variety	Order											
D	3	58	72	96	123	704	889	1800	1706	4615	3243	5198
St	4	70	57	89	68	674	478	2223	1459	3523	2455	3514
SoI	5	64	62	96	82	495	454	1081	1278	1238	1989	2805
SoII	1	66	66	280	235	1543	1412	3968	2600	4370	3853	5472
H	2	85	62	246	186	1039	682	3398	1651	4175	2518	4431

Discussion

β-amylase activity

Analyses of average samples of the different varieties chosen, carried out in four repetitions in both years, showed that there are great differences in β-amylase activities. Choice of the varieties was based on published results indicating that six-rowed barley usually has a higher β-amylase activity than two-rowed. (Bamann and Myrbäck 1941, Myrbäck and Neumüller 1951). The range of barleys in Czechoslovakia had not so far been investigated from this point of view. The review of parent varieties in table 4 shows that six-rowed H barley is in fact the most active when activity is related to the dry weight of the sample. Both the two-rowed varieties are much less active. The relation of activities of both six-rowed barleys of the four-rowed type SoI and SoII is interesting. The first approaches the activity of the six-rowed H, while the second is still less active than little-active two-rowed variety St. In 1956 it showed a rather higher activity in average samples from selected grain, but in analyses of individuals it is definitely the least active. In general the parent varieties can be divided into two groups: 1. highly active varieties showing in 1956 activity within the range 170 to 190 activity units (H, SoI); 2. slightly active varieties with activity in the same year within the range 130 to 160 activity units (D, St, SoII). Both two-rowed varieties are also significantly different. In both years D is more active than St.

The evaluation of these two varieties will contribute to more exact knowledge of the Czechoslovak range of barleys. Comparison of the two-rowed varieties originating from regional barleys and of varieties from the group "Kneifl barleys" will be important for the further improvement of Czechoslovak barleys as regards these characters. Both the newly-selected barleys SoI and SoII could be better evaluated if their origin were known. H barley is not cultivated in Czechoslovakia, it is probably a primitive form in the description of material of the botanical variety mentioned.

The low β-amylase activity found for SoII is interesting from two points of view. In the type of its ears it belongs to the group of six-rowed barley, but its activity is lower than that of the two-rowed varieties. It shows high increases in α-amylase activity during germination and reaches high values within a short time. Some authors have pointed out the possibility of a positive correlation between the activities of the two forms of amylase, but this variety does not bear this out. A new genetical study of this correlation will be necessary. There is also the possibility that this variety behaves like the American

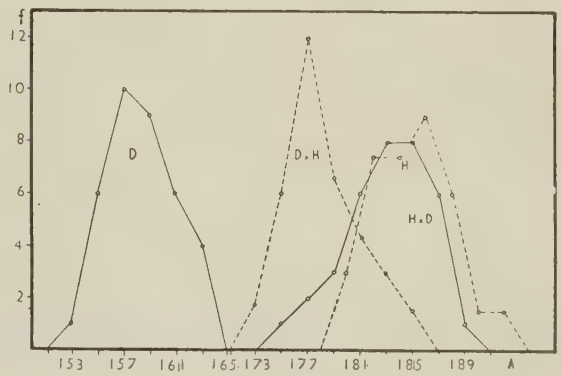


Fig. 5. Variability of β-amylase activity in parent varieties and their F_1 generation. For an explanation of the marking of varieties and their crosses see text. Abscissa: activity units. Ordinate: frequency in different variation classes, converted to corresponding magnitudes of variation sets.

variety Peatland as described by Bendelow and Meredith (1955) and others, that is, that due to some as yet unknown characters it shows a lower activity in the measurements than in fact exists. It is also necessary to take into consideration the fact that from the crossing of highly-active six-rowed forms with slightly-active two-rowed forms there may be produced slightly-active six-rowed forms, as found by Day, Down and Frey (1955). These assumptions, or their more exact formulation, can only be achieved by further work.

Analysis of the variation of values of β-amylase activities of parent varieties in both years showed that the whole set of agroecological factors of the external environment plays an important part the formation of these characters. Their share in total variability is the highest. 1956 was a very unfavourable year, it was wet and therefore produced a strong deviation. The varietal component also plays an important part in the total variability and points to the genetic nature of the character. The variability component involved in the different replications is insignificant as compared with the others and thus does not interfere with the measurement of other components. Of the interactive components, the most important is the interaction of the influences of varieties and years, which points to the varietal nature of the reaction to changing climatic conditions in the different years. Since the interactive component of variety and replication influence is greater than that of replications alone, there would seem to be also a specific reaction of varieties to soil conditions. The interactive component of the influence of years and replications is also higher than that of replication alone. This is due to change

in the quality of the plots on which the experiment was carried out in the different years.

The modification of the method of individual analysis was found to be so sensitive that it was able to record individual differences. It is, however, necessary to take into acount in relation to the values for each individual the range of fluctuation of values from repeated analyses of the same sample

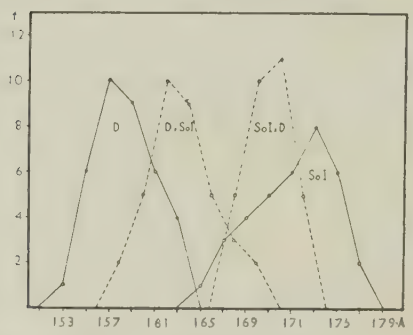


Fig. 6. Variability of β-amylase activity in parent varieties and their F_1 generation. For an explanation of the marking of varieties and their crosses see text. Abscissa: activity units. Ordinate: frequency in different variation classes, converted to corresponding magnitudes of variation sets.

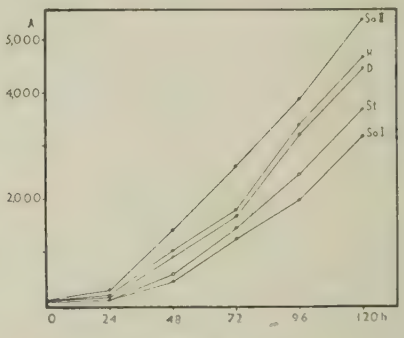


Fig. 7. Dynamics of increases in α-amylase activities in the varieties examined during germination. For marking of varieties see text. Abscissa: germination time in hours. Ordinate: activity units.

and the variation curve of the set and to regard this as an approach to the actual curve within the range of the known fluctuation of values caused by errors in the method. Comparison of the variation curve of one variety, obtained from analyses of 50 individuals, with the curve of normal distribution showed satisfactory agreement. It is therefore possible to state that the individual variability of β-amylase activities is normally distributed.

Satisfactory agreement is also found when comparing the average values calculated from sets of indidividuals separately characterised for β-amylase activity with the values for the activities of average samples of selected grain of the same varieties. A more marked difference is evident only for the variety SoII. Average samples of selected grain show much higher values than the average for individual analyses. This divergence can be explained as being due to a greater number of very undeveloped grains from lateral flowers in the harvest from single individuals.

The standard errors of the averages are fairly low, so the significance of differences is high. The values of the standard errors corresponded for both years.

In comparing the standard deviations as a measure of variation range it was found that in 1955 there was a greater variation range for the same species than in 1956. It is not possible, however, to draw any conclusions from this, for the samples for individual analyses could not be taken completely at random, but had to be limited to those plants with a total yield

of over 5 g. of grain. In general, the values for standard deviations indicate that the variation range of the character reaches values similar to those for other physiological characters.

It follows from the above analysis of β-amylase activity of parent varieties that this character can be studied genetically. It has been possible to evaluate only the first filial generation of various combinations of crosses of parent varieties.

It is interesting to note that the F_1 generation from reciprocal crosses of the same combination are in most cases significantly conflicting. Their variation curves are mutually shifted on the x axis in the direction of the maternal variety, as can be seen from the respective graphs.

The results obtained must, however, also be judged from another point of view. In some cases, when naked and glumed barleys or barleys with different degrees of gluminess are compared, it is necessary in the interests of accurate measurement to ascertain the gluminess and convert the values of β-amylase activity to dry weight of grain without glumes (table 5). In the present investigation it was only possible to make this convertion for the varieties in 1955, as the determination of gluminess is very lengthy. From the above-named table it is evident that the order of varieties is not changed. varietal differences are only more emphasised. A completely different picture is obtained, however, when the average activity of the different varieties is converted to the dry weight of 1,000 of their average grains. As can be seen from table 6, varietal differences are eliminated in this conversion and the order of varieties is fundamentally changed. The need for this conversion resulted from the discovery of significant intervarietal negative correlations between the weight of 1,000 average grains and the average activity of β-amylase. This indicates the advantage offered by such a conversion for improvement work in certain cases. Selection according to activity, related to the weight of 1,000 grains, would at the same time provide selection according to two important characters and, because a negative correlation is involved, the material selected would be narrowed down considerably for further tests. It will, of course, be necessary to examine these relations further. both intra- and intervarietally and also in later hybrid generations. When applying this method of selection it must be borne in mind that a good malting barley can also be of a smaller-grained type, which would be unfavourably classified by this method.

A brief examination of the values converted in this way for the F_1 generation shows that not all combinations are similarly affected. There are fundamental deviations in the order for all combinations in which variety SoI and the combinations of two-rowed varieties with SoII are involved. The remainder keep approximately within the same range of values. The reciprocal crosses maintain very significant differences and in the cases where parents are placed in an opposite order by the new evaluation, the F_1 generations are usually similarly orientated.

Examination of the correlation relations of β-amylase activities and the average size of grains provided only two statistically significant correlation coeficients for intra-varietal correlation. Since, in view of the small range of the series examined, it was not possible to prove whether these selected series

also exhibit normal distribution of the average grain sizes and whether they correspond to the character of the original varietal series, their significance is reduced.

Both for the varieties and for the F_1 generation a negative intervarietal correlation of both the characters examined was found. The correlation coefficients provide convincing evidence of the actual existence of this relation. This is in agreement with the findings of other authors (Anderson, Sallans and Meredith 1941, et al.).

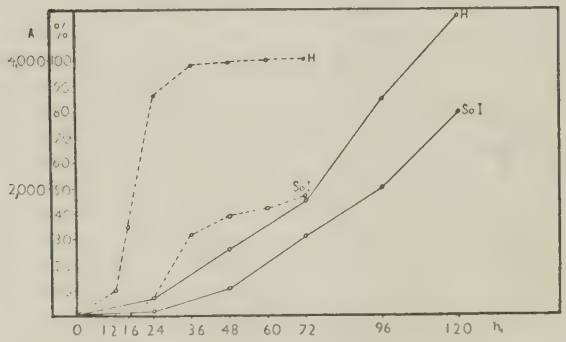


Fig. 8. Relation between germination energy and the dynamics of increases in α-amylase activity. For marking of varieties see text. Abscissa: germination time in hours. Ordinate: activity units and percentage of germinated grains. Continuous line: α-amylase activity. Broken line: germination energy

α-amylase activity

α-amylase activity could also be studied as a character typical for varieties. This was already confirmed by the analysis of variance made for the purpose of evaluating the method. Further analyses of variance of values relating to this character gave a highly significant share for varieties in the total variability. The variability component for replications is quite insignificant with regard to the varietal component, but higher than the methodical. It is, therefore, also necessary to take into consideration the influence of variations in soil, even though the determination of activity is not yet sufficiently accurate and the extent of the experiment is not great enough to enable this influence to be accurately statistically delimited. The effect of changes in a whole range of agroecological factors in the different years is more evident from the analysis of variance in table 12. Its extent is not sufficient to provide statistically significant values, but can be judged relatively. The influence of varieties preponderates over the influence of external factors. This is in agreement with the behaviour of germination energy with regard to these influences. As has already been demonstrated, the reverse is the case for β-amylase, the behaviour of which in this respect corresponds more closely with grain size.

Comparison of the different varieties as regards the activities of the two amylases is interesting. As has already been mentioned, the variety SoII achieves the highest α-amylase activities most rapidly and shows the lowest β-amylase activity in the ungerminated grain. Variety SoI, which has the slowest development of α-amylase activity during germination, takes second place as regards β-amylase activity. The H variety shows a relatively high

activity for both amylases. Of both the two-rowed varieties, D variety has the higher activity of both amylases. Thus it would be possible to speak of a positive correlation of the activities of both amylases only for the two two-rowed varieties and H variety. This correlation demands further and more thorough genetical study.

From the technological point of view it would be interesting to ascertain whether it is possible to achieve the same malting effect in varieties with similar activities and in those with diverse activities.

Further calculations for α-amylase activities were not made, because the accuracy of the determinations is not great enough to allow of reliable operation with such values.

The relation between α-amylase activity and germination energy, which was also ascertained in the course of this work, is shown for two varieties in graph 8.

Acknowledgment:

In conclusion, the author wishes to express his thanks to his teacher, Prof. Dr. K. Hrubý for his interest in this work, to Dr. V. Pokorný for valuable comments on the evaluation of results and to the employees at the genetical garden, particularly B. Kalinová, for technical assistance. Thanks are also due to J. Fadrhons, head of the Cereals Department of the Sugar-beet research station at Semčice, for providing the original material and Ing. J. Kastner and Ing. J. Janáček for the loan of the manuscript of their paper before its publication.

References

Anderson, J. A., Sallans, H. R., Meredith, W. O. S.: Varietal differences in barleys and malts. — Canad. J. Research **19**C : 278—291, 1941.

Bamann, E., Myrbäck, K.: Die Methoden der Fermentforschung. — Leipzig, 1941.

Bendelow, V. M., Meredith, W. O. S.: Reliability of prediction tests for malting quality of barley. — Canad. J. agric. Sci. **35** : 251—258, 1955.

Blom, J., Bak, A.: Über die Bestimmung von Amylasen durch Verflüssigung von Stärkekleister. — Ztschr. physiol. Chem. **256** : 197—207. 1938.

Day, A. D., Down, E. E., Frey, K. J.: Association between diastatic power and certain visible characteristics and heritability of diastatic power in barley. — Agron. J. **47** : 163—165, 1955.

Kastner, J., Janáček, J.: Stanovení β-amylasy v ječmeni [Determination of β-amylase in barley]. — Ročenka VÚO Kroměříž, in press.

Myrbäck, K., Myrbäck, S.: Über Gersten- und Malzamylase. — Biochem. Ztschr. **258** : 158—171, 1933.

Myrbäck, K., Neumüller, G.: Stärke und Glykogen enzymatische Synthese und Hydrolyse. — Erg. Enzymforschung **12** : 2—88, 1951.

Nečas, J.: Dědičnost některých plynule proměnlivých znaků ječmene [The heritability of some continuously variable characters in barley.] Diss.-Institute of Genetics, Charles University, Praha 1957.

Pawlovski, J., Doemens, A.: Die brautechnischen Unteruchungsmethoden. München-Berlin, 1938.

Sandergren, E., Klang, N.: J. Inst. Brew. **56** : 313—318, 1950. (Cit. Kastner and Janáček.)

Address: Josef Nečas, Prom. Biol., Výzkumný ústav bramborářský ČSAZV, Valečov u Havlíčkova Brodu, Czechoslovakia.

BIOL. PLANT. 2 (1) : 1—18, 1960

Наследственность амилолитической активности ячменя

ЙОЗЕФ НЕЧАС

Отделение генетики кафедры физиологии растений, микробиологии и генетики Карлова Университета, Прага

Резюме

В данной работе была исследована наследственность активности амилазы ячменя.

1. Было подтверждено, что активность β-амилазы ячменя заложена наследственно и что соответствующие данные в отдельные годы характерны для каждого сорта. В отдельные годы изменяющиеся внешние условия оказывают очень сильное влияние на проявление данного признака. Индивидуальная изменчивость признака в наборах распределена нормальным образом. В поколении F_1 при скрещивании сортов с различной, генетически заложенной активностью, как правило, имеет место приблизительно промежуточный характер этого признака со слабым преобладанием более высокой активности. Реципрокные скрещивания не являются сходными и здесь явственно проявляется влияние материнской породы. Корреляция между величиной зерна и активностью β-амилазы отрицательна.

2. Активность α-амилазы также наследственно заложена. Отдельные сорта, проращиваемые одинаковое время при одинаковых условиях, обладают различной степенью активности. Также динамика прироста активности α-амилазы в течение прорастания при одинаковых условиях у отдельных сортов разная и находится в отрицательной корреляции с энергией прорастания. Из-за длительной методики это свойство не могло быть исследовано у наборов гибридов.

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

2 (1) : 19—26, 1960

Content of Different Forms of Vitamin C in Potatoes Treated with Ethylene Chlorhydrin

Anastázia Ginterová

Department of Plant Physiology, Institute of Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

Received May 4, 1959

Súhrn

V pletive z oblastí očiek dormantných zemiakov bola kolorimetrickou metódou s 2,4-dinitrofenylhydrazínom sledovaná hladina l-askorbovej kyseliny, dehydroaskorbovej kyseliny a viazanej formy vitamínu C v priebehu klíčenia po ovplyvnení hľúz etylénchlórhydrínom. V prvom týždni po aplikácii sa hladina askorbovej kyseliny výrazne nemení, kým hladina dehydroaskorbovej kyseliny silne klesá. Tento pokles pretrváva i v ďalších fázach pokusu a až na 4. týždeň sa vracia hladina dehydroaskorbovej kyseliny k normálnym hodnotám. Hladina l-askorbovej kyseliny javí klesajúcu tendenciu, ale jej výrazný pokles nastáva až vo 4. týždni pokusu. Koncentrácia viazanej formy vitamínu C sa v priebehu celého pokusu výrazne nemení.

Na základe získaných výsledkov sa uzatvára, že etylénchlórhydrín intenzívne zasahuje do oxydoredukčných systémov zemiakovej bunky popri iných možných spôsoboch i tým, že narúša rovnováhu v dôležitom oxydoredukčnom systéme, vytváranom l-askorbovou a dehydroaskorbovou kyselinou. Viazaná forma vitamínu C pravdepodobne nehrá v procese klíčenia významnú úlohu.

Summary

The levels of l-ascorbic acid, dehydroascorbic acid and of the bound form of vitamin C were investigated in the tissue from the vicinity of eyelets of dormant potatoes after treating the tubers with ethylene chlorhydrin. During the first week after exposure the l-ascorbic acid level does not change significantly while the dehydroascorbic acid level decreases markedly. This decrease persists even during the following weeks and returns to normal only on the fourth week after treatment. The l-ascorbic acid level displays a decreasing tendency but a marked decrease may be observed only during the

fourth experimental week. The level of the bound form of vitamin C does not change significantly for the whole duration of the experiment.

It can be concluded on the basis of the results obtained that ethylene chlorhydrin deeply affects the oxidation-reduction systems of the potato cell, among other possibilities by disturbing the equilibrium of the important oxidation-reduction system formed by l-ascorbic and dehydroascorbic acid. The bound form of vitamin C does not appear to play a significant role in the process of sprouting.

Introduction

The mechanism of action of ethylene chlorhydrin (further only EtClOH) which was shown to act as an effective stimulant in disturbing the dormancy of potatoes, has not hitherto been satisfactorily explained. The problem of the effect of this substance on the level of vitamin C in potato tubers was taken up by a number of authors (Pett 1936; Guthrie 1936; Schulze and Fischnich 1951) but there are some discrepancies in their results. As l-ascorbic acid plays a very important, even if not quite clear, role in oxidation-reduction reactions taking place in potato tubers, an attempt was made to contribute to the solution of this set of problems. The submitted paper extends the so-far studied relation of EtClOH to vitamin C metabolism by investigating the changes in the levels of dehydroascorbic acid and the bound form of vitamin C in potato tubers.

Material and Methods

The colorimetric method of Roe and Kuether (1943) was used to estimate the total vitamin C concentration in the form of l-ascorbic and dehydroascorbic acid; the method employs the intense colouration produced by the condensation product of dehydroascorbic acid with 2,4-dinitrophenylhydrazine. A sample from the vicinity of a potato eyelet (about 500 mg.) was homogenized with silica sand and 20 ml. 6% trichloracetic acid; the amount of dehydroascorbic acid was determined in the filtrate after the oxidation of ascorbic acid with active carbon.

Dehydroascorbic acid as such was estimated by a modification of the same method (Roe et al. 1948) which consists in extracting with a mixture of 6% trichloracetic acid and 1% thiourea (the latter substance prevents the oxidation of ascorbic acid in the course of extraction and further procedures); no active carbon oxidation is used.

The data for total free vitamin C concentration and for dehydroascorbic concentration permit the calculation of the concentration of l-ascorbic acid.

The bound form of vitamin C was estimated according to Sumerwell and Sealock (1952). The analytical procedure consists in the removal of the free form of vitamin C by a multiple extraction of the sand homogenate of the eyelet tissue with ethanol and in estimating the vitamin C content by the dinitrophenylhydrazine method following acid hydrolysis of the tissue with metaphosphoric acid. This method was developed for animal tissues and some difficulties may be encountered in its application to potato tubers. The tissue residue after extraction contains a large amount of starch which gelatinizes and is hydrolyzed in the course of acid hydrolysis. Consequently, the resulting solution has a high viscosity (it has to be centrifuged in place of filtering) and contains a high concentration of glucose which diminishes the specificity of the method. This drawback was somewhat compensated by using starch solutions of approximately the same concentration as found in the samples as blanks; these blanks were subjected to the same analytical procedure as the experimental samples. Usually 3 g. of tissue was used for the estimation of the bound form of vitamin C and 4 parallel samples were analyzed. Total vitamin C and dehydroascorbic acid were estimated in 6 parallel samples.

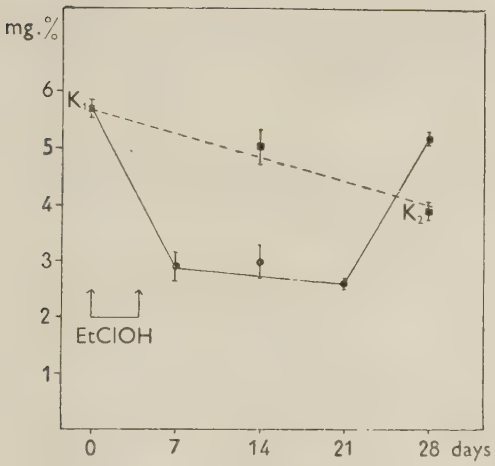


Fig. 1. Changes in levels of total free vitamin C (l-ascorbic acid and dehydroascorbic acid)in the course of sprouting of potato tubers, treated with ethylene chlorhydrin. Time of ethylene chlorhydrin treatment is shown by arrows. Dotted line — control; full line — experimental.

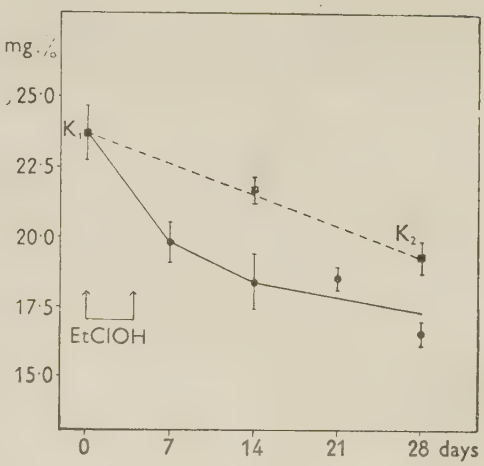


Fig. 2. Changes in levels of dehydroascorbic acid in the course of sprouting of potato tubers, treated with ethylene chlorhydrin. Dotted line — control; full line — experimental.

Material, experimental arrangement as well as the EtClOH treatment of potatoes were identical with those used in the previous paper (Gintterová 1959a). The selection of samples in the vicinity of potato eyelets was influenced by the fact that the distribution of various substances in a potato tuber is not uniform and that the most intense changes during sprouting can be observed in the vicinity of the eyelet.

Results

1. Total vitamin C

It was found that EtClOH brings about a sharp decrease in the total vitamin C content which can be observed during the first week after the beginning of treatment and persists for the whole duration of the experiment (Fig. 1). The decrease in vitamin C content may be observed even in control tubers (K_2) toward the end of the experiment, which is in agreement with the data of numerous authors for potato storage. It should be emphasized, however, that the decrease in total vitamin C content, caused by the EtClOH treatment is considerably more marked and cannot be interpreted as a result of vitamin C content decrease caused by storage.

2. L-ascorbic acid

It follows from the data of Table 1 that the level of ascorbic acid does not appreciably change during the first week after EtClOH treatment. During the following weeks a decreasing tendency may be observed which is not statistically significant. Only the results obtained on the 28th day after the beginning of the experiment display a marked, statistically very significant decrease.

3. Dehydroascorbic acid

The changes in dehydroascorbic acid level are of great interest. During the first week after exposure to EtClOH a sharp decrease takes place, the lower level persisting for two more weeks. The decrease in total vitamin C content which could be noted in the first week after exposure

to EtClOH appears thus to be caused mainly by the decrease in the content of the dehydroform of vitamin C. Only toward the end of the experiment, when the tubers sprout intensely, did the dehydroascorbic acid level return to normal — Fig. 2. On account of these changes the ratio ascorbic acid: dehydroascorbic acid changes very strikingly.

4. The bound form of vitamin C

It was found that only a small part of potato tuber vitamin C appears to exist in the bound form. After exposure to EtClOH an oscillation of the average values of bound vitamin C content takes place (Table 1) but the individual differences cannot be interpreted as significant on account of the considerable variation in analytical results.

Table 1. Changes in levels of various forms of vitamin C in potato tubers treated with ethylene chlorhydrin

Week	Form of vitamin C (mg.%)			
	Ascorbic acid	Dehydroascorbic acid	Total free vitamin C	Bound form of vitamin C
I. Control Nov. 7	18·0 ± 1·8	5·7 ± 0·2	25·7 ± 2·0	3·8 ± 0·7
II.	16·9 ± 1·4	2·9 ± 0·5	19·8 ± 1·4	4·6 ± 1·2
III.	15·0 ± 1·8	3·0 ± 0·6	18·4 ± 2·0	not measured
IV.	15·9 ± 0·8	2·6 ± 0·1	18·5 ± 0·8	2·0 ± 0·4
V.	11·4 ± 1·0	5·2 ± 0·2	16·6 ± 0·9	2·5 ± 0·3
VI. Control Dec. 12.	15·4 ± 1·1	3·9 ± 0·3	19·3 ± 1·1	2·7 ± 0·3

Discussion

As was mentioned in the introduction, no uniformity exists in the problem of dynamic changes of vitamin C content in potatoes treated with EtClOH. Schulze and Fischnich (1951) and Pett (1936) found an increase in vitamin C level during the first day after EtClOH treatment. Guthrie (1937) observed a similar increase only with long-stored potatoes with a low vitamin C content, whereas in freshly harvested tubers EtClOH had no effect on the level of this vitamin. It should be emphasized that all the above authors determined only l-ascorbic acid (Pett 1936; Guthrie 1937, used titration with dichloroindophenol, while Schulze and Fischnich 1951, used a very little specific method, probably an iodometric titration estimating thiol compounds along with ascorbic acid, but no detailed description is given). These results are difficult to interpret as adequate for vitamin C estimation.

In our experimental set-up no increase in ascorbic acid level could be observed. On the contrary, there was a decreasing tendency which became marked and statistically significant only toward the end of the experiment. The difference between our results and those of PETT (1936) and GUTHRIE (1937) may be due to the fact that short-stored potatoes were used in our experiments, containing a high level of vitamin C, as well as to a different time interval after EtClOH treatment. The maximum increase in ascorbic acid level was observed by the above authors directly after EtClOH treatment and GUTHRIE himself mentions the possibility that the increased ascorbic acid level could be brought about by slicing rather than by EtClOH. During later experimental stages the level of ascorbic acid decreased in the experiments of the above authors to well below that of the control untreated tubers. On account of the fact that analysis of ascorbic acid level was carried out on the 7th day after EtClOH treatment in our experiments it may well be that our data correspond to the phase when ascorbic acid level decreases. It is, therefore, probable that the discrepancy between the two sets of results is only incidental, due to a different experimental arrangement.

The effect of EtClOH on the metabolism of dehydroascorbic acid has not been studied so far. Even if some authors doubt the very existence of dehydroascorbic acid in plant tissues, general reports from this field (KURTS 1950; FRANKE 1957) provide convincing evidence about the presence of this compound in plant tissues, including potato tubers. Our findings support the existence of dehydroascorbic acid in potato tubers and its concentration is in good agreement with the data of FRANKE (1957), although a different analytical method was applied.

It was shown in our results that after EtClOH treatment the level of dehydroascorbic acid drops sharply but returns to normal on the fourth week of the experiment. The continuous decrease in total vitamin C content, observed after EtClOH treatment appears to be due to dehydroascorbic acid during the first phase of the experiment while during the later stages it is due to l-ascorbic acid.

The results presented here may be of especial importance because they indicate that EtClOH affects the oxidation-reduction conditions in the potato cell. It appears likely that the greatly altered ratio of l-ascorbic acid: dehydroascorbic acid indicates the existence of marked changes in the oxidation-reduction systems of the potato tuber. EtClOH apparently affects the equilibrium of some important oxidation-reduction systems in the direction of the reduced forms. This holds both for the l-ascorbic-dehydroascorbic acid system studied here and for the sulphydryl-disulphide system (GINTEROVÁ 1959b).

Two closely associated questions arise in connection with the above fact: What is the cause of such a shift in the redox equilibrium, and what are its metabolic effects. On the basis of the literature data it can be assumed that the redox equilibrium shift toward reduced forms is a result of an intensification of oxidation-reduction processes. This is supported by the paper of KURTS (1950) as far as the system ascorbic acid: dehydroascorbic acid is concerned. The author studied the ratio of the two acids in potatoes during different periods and found that a high content of dehydroascorbic acid is character-

istic of deeply dormant potatoes whereas in potatoes nearing the termination of dormancy the dehydroascorbic acid level decreases. Similar data were obtained by KURTS for other plant species. In his experiments an increase in the intensity of metabolic processes was always associated with a decrease in dehydroascorbic acid level.

The change in the redox potential appears to have a great effect on the activity of some enzymes. The increased reducing capacity of the protoplasm prevents the oxidation of important components of most enzymes, namely of sulphydryl groups. Therefore, it can be assumed that an increase in the ascorbic acid: dehydroascorbic acid ratio stimulates the activity of some enzymes. This assumption is supported by a paper of the above author (KURTS 1950) who found that plant tissues possessing a high ascorbic : dehydroascorbic ratio also display a high activity of oxidation systems, and further by the findings of several authors who demonstrated a stimulating effect of l-ascorbic acid on enzymes, consisting in the protection of active groups on the enzyme surface.

On the basis of the above findings it can be concluded, that EtClOH causes an increase in the respiration of potato tubers (SMITH 1929; MILLER 1933a) and in the activity of oxidation enzymes, such as peroxidase and catalase (MILLER et al. 1929; DENNY et al. 1930; MILLER 1933b; SATAROVA 1953); at the same time, it increases the ascorbic: dehydroascorbic ratio. Whether we are dealing here with a secondary phenomenon caused by the stimulating effect of EtClOH on oxidative catabolic processes, or whether, on the contrary, the alteration of the equilibrium of this system causes an activation of oxidative enzymes, cannot be decided at present. In any case, however, the change in the ratio of the two acids can be interpreted as further evidence for the effect of EtClOH on oxidation-reduction processes in treated tubers.

It is advisable to be careful in interpreting the data obtained for the bound form of vitamin C, on account of some unsolved methodical problems. The existence of the bound form of vitamin C in potato tubers *per se* is problematic (MARX 1954), although numerous workers postulate it (HOLTZ and REICHEL 1940; SUMTSOV 1950). Our results cannot be taken as conclusive evidence for the existence of the bound form of vitamin C in potatoes. As no significant changes in the content of the bound form could be observed even in intensely sprouting tubers it is assumed that it plays no important role in the sprouting process.

References

DENNY, F. E., MILLER, L. P., GUTHRIE, J. D.: Enzyme activities of juices from potatoes treated with chemicals that break the rest period. — Amer. J. Bot. **17** : 483—509, 1930.

FRANKE, W.: Über das Vorkommen der Dehydroascorbinsäure in Pflanzen und ihre Beziehung zum Vitamin-C-Problem. — Biol. Zbl. **76** : 148—163, 1957.

GINTEROVÁ, A.: The effect of ethylene chlorhydrin on carbohydrate metabolism in potatoes. — Biol. Plant. **1** : 258—265, 1959a.

GINTEROVÁ, A.: Mechanizmus pôsobenia etyléncblórhydrínu na dormantné hľúzy *Solanum tuberosum* [The mechanism of action of ethylene chlorhydrin on dormant tubers of *Solanum tuberosum*]. — Biol. práce 1959b, Bratislava.

Guthrie, J. D.: Factors influencing the development of ascorbic acid and glutathione in potato tubers following treatment with ethylene chlorhydrin. — Contrib. Boyce Thomp. Inst. **9** : 17—39, 1937.

Holtz, P., Reichel, Ch.: Über die gebundene Ascorbinsäure in Pflanzen. — Klin. Wchschr. **19** : 461—463, 1940.

Kurts, F. A.: Okislitelno-vosstanovitelnye protsessy i svyaz dvukh vidov askorbinovoy kisloty v rasteniyakh [Oxidation-reduction processes and connection between two types of ascorbic acid in plants]. — Dokl. AN SSSR **72** : 81—83, 1950.

Marx, Th.: Zum Nachweis einer Eiweiss gebundenen l-Ascorbinsäure in frischem Pflanzenmaterial. Z. Lebensmit. — Unt. Forschung, **99** : 261—264, 1954.

Miller, L. P.: Effect of various chemicals on the sugar content, respiratory rate and the dormancy of potato tubers. — Contrib. Boyce Thomp. Inst. **5** : 213—234, 1933a.

Miller, L. P.: Effect of sulphur compounds in breaking the dormancy of potato tubers and in inducing changes in the enzyme activities of the treated tubers. — Contrib. Boyce Thomp. Inst. **5** : 29—81, 1933b.

Miller, L. P., Guthrie, J. D., Denny, F. E.: Enzyme studies in potato juice from tubers treated with chemicals that break the rest period. — Amer. J. Bot. **16** : 850—868, 1929.

Pett, L. B.: Changes in the ascorbic acid and glutathione content of stored and sprouting potatoes. — Bioch. J. **30** : 1228—1232, 1936.

Roe, J. H., Kuether, C. A.: Determination of vitamin C in blood and urine by means of the compound of 2,4-dinitrophenylhydrazine with dehydroascorbic acid. — J. Biol. Chem **147** : 339—406, 1943.

Roe, J. H. a spol.: The determination of diketo-l-gulonic acid, dehydro-l-ascorbic acid and l-ascorbic acid in the same tissue extract by the 2,4-dinitrophenylhydrazine method. — J. Biol. Chem. **174** : 201—204, 1948.

Satarova, N. A.: Vliyanie khimicheskikh stimulyatorov na izmeneniya kolloidnokhimicheskikh osobennosty protoplazmi i na aktivnost peroksidazy v klubnyakh kartofelya [The effect of chemical stimulants on changes in colloidal properties of protoplasm and on the activity of peroxidase in potato tubers]. Dokl. AN SSSR **93** : 1119—1122, 1953.

Sumtsov, B. M.: Svyazannaya forma askorbinovoy kisloti v organizme (askorbigen) [The bound form of ascorbic acid in the organism (ascorbigen)]. — Biokhimia **15** : 112—120, 1950.

Schulze, W., Fischnisch, O.: Über Keimförderung und stoffliche Veränderungen in der Kartoffelknolle bei Beginn und im Verlauf der Keimung. — Hannover 1951.

Smith, O.: The effect of various treatments on the carbon dioxide and oxygen in dormant potato tubers. — Hilgardia **4** : 273—306, 1929.

Sumerwell, W. N., Sealock, R. R.: The determination of bound ascorbic acid in liver tissue. — J. Biol. Chem. **196** : 753—759, 1952.

Address: Ing. A. Ginterová, Ústredný výskumný ústav potravinárského priemyslu, Miletičova 14 B, Bratislava. Czechoslovakia

BIOL. PLANT. 2 (1) : 19—26, 1960

Динамика витамина С в растениях картофеля, обработанного этиленхлоргидрином

Анастазия Гинтерова

Отделение физиологии растений, Биологический институт Словацкой Академии Наук, Братислава

Резюме

В тканях из областей глазков картофеля в период покоя было колориметрическим методом с 2,4-динитрофенилгидразином исследовано содержание С-аскорбиновой кислоты, дегидроаскорбиновой кислоты и связанной формы витамина С в течение прорастания после обработки клубней этиленхлоргидрином. В течение первой недели после обработки содержание аскорбиновой кислоты значительно не меняется, в то время как сильно падает содержание дегидроаскорбиновой кислоты. Это падение продолжается в течение дальнейших фаз опыта и лишь на четвертой неделе содержание дегидроаскорбиновой кислоты возвращается к норме. Уровень же С-аскорбиновой кислоты имеет тенденцию к снижению, однако, видимое падение имеет место лишь на четвертой неделе опыта. Концентрация связанной формы витамина С в течение всего опыта не меняется.

На основе полученных данных можно сказать, что этиленхлоргидрин интенсивно влияет на окислительно-восстановительные системы картофельной клетки, кроме прочих возможных способов также путем нарушения равновесия в важной окислительно-восстановительной системе, состоящей из С-аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот. Связанная форма витамина С, вероятнее всего, не играет важной роли в процессе прорастания.

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

2 (1) : 27—42, 1960

Количественная оценка серологических реакций путем измерения помутнения в сравнительной серологии растений

Йозеф Клоз

Отдел физиологии растений Биологического института ЧСАН, Прага

Поступило 21 мая 1959 г.

Souhrn

V této metodické práci uvádíme praktický postup při použití kvantitativní sérologické metody, drobné modifikace a technické úpravy tohoto postupu se zvláštním zřetelem k umožnění práce s labilními rostlinnými bílkovinami, zejména z vegetativních orgánů.

Vycházíme z osvědčené metody, propracované Boydenem a spolupracovníky a za použití Libbyho „photronreflectometru". V práci uvádíme výsledky, kterými jsme si ověřovali vhodnost a vliv zejména těchto našich drobných modifikací na kvantitativní vyhodnocování sérologických reakcí:

a) Použití „acetonových preparátů" při přípravě antigenů: Jedinou operací se zbavíme značné části nežádoucích příměsí jako jsou lipidy, organické kyseliny, tanin, alkaloidy apod., při zachování antigenní aktivity bílkovinného materiálu. Zároveň tím značně zvýšíme jeho uchovatelnost v suchém stavu na řadu měsíců.

b) Stabilisace roztoků rostlinných antigenů přídavkem 5% fruktosy. Tím zabráníme podstatně denaturaci rostlinných bílkovin v roztocích uchovávaných zmrznutím a zvýšíme použitelnost roztoků rostlinných antigenů na řadu dní.

c) Úprava inkubační doby a inkubační teploty při provádění kvantitativní precipitace za účelem lepší standardisace práce; zároveň snížení dávek antiséra.

d) Standardisace cejchování Libbyho „photronreflectometru".

e) Použití Rungeho fysiologického roztoku; dále kyseliny askorbové k omezení tvorby melaninů u antigenních extraktů z rostlinného materiálu.

Резюме

В статье описаны практические приемы количественного серологического метода и мелкие технические видоизменения данного метода, позволяющие работать с лабильными растительными белками, в особенности с белками, полученными из вегетативных органов растений.

Работа основана на проверенном методе, разработанном Бойденом и его сотрудниками, применившими «фотронрефлектометр» Либби. Ниже приводятся результаты измерений, проводившихся прежде всего с целью проверки наших новых видоизменений этого метода и их влияния на количественную оценку серологических реакций:

а) Применение «ацетоновых препаратов» в процессе приготовления антигенов. При помощи одного единственного приема можно избавиться от большей части вредных примесей, которыми являются липиды, органические кислоты, танин, алкалоиды и т. п., при сохранении антигенных свойств белкового материала. Одновременно значительно повышается его способность к хранению в сухом виде в течение ряда месяцев.

б) Стабилизация растворов растительных антигенов прибавлением 5% фруктозы. Последняя существенно противодействует денатурации растительного белка в растворах, хранимых в замороженном виде. Срок, в течение которого указанные растворы сохраняются в применимом виде, таким образом можно продлить на несколько дней.

в) Видоизменения времени и температуры инкубации при количественной преципитации с целью лучшей стандартизации работы; одновременно снижение доз антигенной сыворотки.

г) Стандартизации градуирования «фотронрефлектометра» Либби.

д) Применение физиологического раствора Рунге; прибавление аскорбиновой кислоты с целью торможения образования меланинов в антигенных экстрактах из растительного материала.

Введение

Серологические реакции являются строго специфичными (определенные антитела реагируют только с антигенами, вызывающими их образование или с близкородственными антигенами) и очень чувствительны. Поэтому вскоре стали применять серологические реакции также при ботанических исследованиях (например, при идентификации разных растительных продуктов, в вирусологии; успешно применялись также в области систематики растений для исследования степени родства растительных белков не только у разных таксономических единиц, но и в разных органах одного и того же растения, при изучении белкового метаболизма и при исследовании гибридов: в последнее время появилась также работа, ставящая своей целью установить изменения белков растения *Hyoscyamus niger* L. в связи с яровизацией — Aach и Melchers 1957 и т. п.).

До сих пор не совсем используются все возможности применения серологических методов при решении ботанических вопросов. Однако, необходимо иметь в виду некоторые методические недочеты в работах более старых авторов.

В связи с важным значением серологических методов при генетических, таксономических и физиологических исследованиях, необходимо уделять особенное внимание вопросам методики, начиная с отбора и приготовления антигенов и кончая оценкой реакций.

Проблема количественной оценки серологических реакций имеет важное значение для сравнительной серологии (по Бойдену основным предметом «сравнительной серологии» является различение и идентификация антигенов или же установление их родства — Boyden, 1958).

Еще 30 лет тому назад Мецу из Кенигсберга и его современникам,

работавшим в области сравнительной серологии ботанических таксонов, не удалось успешно справиться с этой проблемой. Этот факт вместе с нестандартными приемами при приготовлении антигенов обусловили субъективность результатов и являлись основными недостатками серологических работ того времени. В настоящее время также в достаточной степени объяснены причины исторического спора между берлинской и кенигсбергской серолого-систематическими школами, который, как оказалось, сводится к вопросам методического характера (см. обзоры Розанова 1946, Cester, 1937 и др.).

По другому пути направил свои исследования Мориц из Кьела. Его методика основана на использовании анафилактической реакции Шульца-Дале, при помощи которой ему удалось установить количественные различия между наборами растительных антигенов и доказать, например, промежуточную комбинацию признаков протеидов у межродовых гибридов, специфичность белков отдельных органов и т. п. (обзор см. в работе Moritz, 1958).

Классический количественный метод Гейдельберга, Макферсона и др., основанный или на определении количества азота в преципитате при помощи микрометода Кьельдаля или же на колориметрическом определении количества тирозина в преципитате при помощи фенольного реактива, был разработан в области общей серологии и для сравнительной серологии, повидимому, является менее пригодным. Хотя и этот метод точен, он гораздо более трудоемок, требует больше времени и связан с более высоким расходом диагностической сыворотки (см. Kaminski и Williams, 1953).

В настоящее время школа Бойдена в США применяет в области сравнительной серологии животных фотоэлектрическое измерение степени мутности при реакциях преципитации. Бойден и его сотрудники исходят из быстрого количественного метода, описанного Либби (Libby 1938a, 1938б), который они применили в сравнительной серологии животных (например, Boyden 1942; Boyden и De Falco 1943; Boyden, Bolton и Gemeroy 1947; Leone 1949; Boyden 1954). Этот метод, наряду с положительными качествами (он довольно быстрый и требует меньше сыворотки) обладает недостатками — чувствительностью к неспецифическим факторам. Первые работы Джонсона, Баума и Хаммонда (Johnson 1954; Baum 1954; Hammond 1955a, 1955b), которые работали с глобулиновой фракцией семян, показывают применимость метода непосредственно в исследованиях по растениеводству.

Необходимо еще сказать о методах сравнительной серологии и особенно о количественном турбидиметрическом методе, применяемых при исследованиях в растениеводстве. В этих методах есть целый ряд возможных источников ошибок. Здесь работают при иммунизации с живыми организмами, реакции которых обусловлены как физиологическими, так и генетическими особенностями, а также и способом иммунизации (схемой иммунизации). Необходимо иметь в виду возможность конкуренции при иммунизации набором антигенов и также разную растворимость отдельных растительных белков в физиологическом растворе. Необходимо иметь в виду изменения белков сыворотки, и в особенности растительных антигенов при хранении (в по-

следнем случае также учитывать присутствие протеолитических энзимов). При проведении реакции между антигеном и антителами in vitro необходимо иметь в виду, что мы работаем со сложными коллоидными системами, скорость и степень преципитации которых может быть до определенной степени обусловлена их современным физико-химическим состоянием, техническими приемами при помощи которых они были доведены до существующего состояния. Их физико-химическое состояние в каждый данный момент может быть обусловлено рядом факторов, например, температурой, pH, количеством и видом присутствующих электролитов, далее случайными примесями, экстрагированными вместе с антителами из растительных тканей, такими как липиды, танин, иногда также белково-неспецифические преципитины (подобные или похожие на фитоаглютинины, которые находятся в запасных тканях некоторых растений) и др. Эти возможные источники ошибок надо иметь в виду и поэтому здесь необходима совершенная стандартизация приемов и аккуратность в течении всей работы.

В нашей работе мы использовали метод Либби-Бойдена, в котором некоторые условия реакции были видоизменены так, чтобы они лучше нам соответствовали с технической точки зрения. Далее мы упростили работу с растительным материалом, применив для целей сравнительной серологии метод Метцнера для приготовления нативных белковых препаратов из растительных органов и, кроме того, мы попытались стабилизировать растворы растительных белковых антигенов, назначенных для иммунизации.

Методика

В данной части описываются все приемы, включая приготовление хорошо сохраняющихся белковых препаратов из растительных тканей и приготовление растворов для иммунизации, собственную иммунизацию и, наконец, количественную оценку серологических реакций. Считаем целесообразным более подробно коснуться тех технических подробностей, при помощи которых удавалось облегчить работу и которые мы считаем более важными.

Подходящие органы растений (проростки или семядоли, листья) очищаются и гомогенизируются 2—3 минуты в охлажденном ацетоне с небольшим количеством окиси магния. Гомогенат фильтруется в воронке Бюхнера, снова промывается сначала охлажденным ацетоном, а затем два раза охлажденным эфиром. После удаления эфира сухое вещество переносится в ступку подходящего размера и растирается. В результате получается рыхлый белый или беловатый порошок.

Описанный метод Метцнера (Metzner 1955) применялся нами успешно также при работе в области сравнительной серологии. Вся работа не должна длиться более 7 минут и температура не должна быть выше 0° С. Ацетон не должен разбавляться водой из тканей ниже 90%.

Мы облегчали себе работу тем, что вся манипуляция проводилась в лаборатории (Метцнер работал в холодильнике при —5° С) и гомогенат содержался при температуре ниже 0° С при помощи следующих мер: чашка

гомогенизатора и воронка Бюхнера предварительно охлаждались в холодильнике до —20° С, ацетон и эфир охлаждались в этаноловой бане с сухим льдом на —40° С и после второй промывки гомогената охлажденным эфиром в воронке Бюхнера на верхний край последней прикреплялось тесно прилегающее кольцо 2 см высотой с натянутым мельничным газом, на который помещался слой толченого сухого льда. Таким образом удается досуха отфильтровать гомогенат при температуре глубоко ниже нуля. Это простое устройство выгодно еще в том отношении, что на слое сухого льда осаждается влага из воздуха, так что материал при отсасывании не сыреет.

Рыхлый порошок хранится в свободно закрытых пузырьках с широким горлом, помещаемых в вакууме в эксикаторы над плавленным $CaCl_2$ при температуре около +3° С.

Описанный способ приготовления антигенного материала оказался очень удобным. Таким образом можно удалить разные примеси и нежелательные вещества, которые могли бы оказаться вредными для иммунизированного животного или которые могли бы отрицательно повлиять на серологические реакции, проводимые in vitro (алкалоиды, органические кислоты, танин, липиды и т. п.) даже в том случае, когда белки сохранились в нативном виде. Описанный способ позволяет также значительно повысить способность субстрата к длительному хранению, так что из последних можно когда угодно приготовить соответствующие антигенные экстракты. Например, у белков из проростков *Phaseolus vulgaris* даже после восьми месяцев хранения в описанных условиях мы не наблюдали снижения антигенной активности. Этим технически упрощаются или даже становятся возможными некоторые долго продолжающиеся работы с лабильным растительным материалом.

Приготовленные таким образом препараты из растительных тканей содержат в основном полисахариды (главным образом, целлюлозу) и нативные белки; антигенами у растений в этом случае можно считать лишь белки.

В следующей таблице мы приводим влияние этого способа приготовления на антигенную активность запасных белков из семян фасоли (*Phaseolus vulgaris* L., сорт Сакса):

Семядоли из слабо проросших семян были разделены на 9 групп. Группы от 1 до 6 гомогенизированы в охлажденном ацетоне, каждая отдельно выше описанным способом, сухой препарат, полученный таким образом, был каждый отдельно экстрагирован физиологическим раствором. Группы 7—9 (свежий материал) растерли каждую отдельно в ступке с физиологическим раствором и с малым количеством стеклянного порошка. Во всех экстрактах, начиная 1 и кончая 9 было определено количество белкового азота, затем они соответствующим образом разбавлялись так, чтобы концентрация белков была везде одинакова. С каждым из экстрактов проводилась двойная серия серологических реакций с гомологичной сывороткой (все эти приемы подробнее описаны ниже).

Результаты приведены в таблице 1.

Из этих данных ясно вытекает, что антигенная активность образцов, гомогенизированных в охлажденном ацетоне (группы 1—6) не была нарушена (среднее — 15,50) и практически не отличается от таковой образцов, приготовленных путем растирания свежего материала (образцы 7—9, среднее по которым составляет 15,95). Средняя методическая ошибка по

Таблица 1.

№ образца	Сумма данных по помутнению		Среднее по обоим повторностям	Отклонение от среднего в %% (15,65=100%)
	1-ая повторность	2-ая повторность		
1	13,42	13,76	13,59	—13,17
2	15,90	15,73	15,81	+ 1,02
3	14,87	15,07	14,94	— 4,55
4	16,45	16,72	16,58	+ 5,88
5	16,21	16,74	16,43	+ 4,98
6	15,56	15,80	15,67	+ 0,12
7	17,17	16,50	16,73	+ 6,25
8	15,46	15,91	15,68	+ 0,17
9	15,77	15,09	15,43	— 1,41

ясем образцам равняется $\pm 4{,}17\%$: квадратическая ошибка равна 0,96583.

Для иммунизации кроликов эти «ацетонные препараты» экстрагируются буферным физиологическим раствором, содержащим 5% фруктозы. Количество раствора подбирается таким образом, чтобы в 1 мл экстракта содержалось приблизительно 10 мг белка.

Обычно применяющийся способ приготовления:

К двум граммам «ацетонного препарата» ростков прибавляется 20 мл буферного физиологического раствора с фруктозой: смесь помещается на 1 час в холодильник, затем помещается в платочки из мельничного газа № 12 XXX, размером 15×15 см и при помощи ручного пресса из нее выжимается сок. Последний хранится в пробирках помещаемых в термос со льдом. К сухому остатку на платочке снова прибавляется 10 мл буферного физиологического раствора с фруктозой, смесь помещается на 30 минут в холодильник и затем второй раз из нее выжимается весь сок. Обе порции сока смешиваются и центрифугируются в течении 30 минут при 15 000 g (14 000 оборотов центрифуги Янецкого). Затем определяется количество азота в экстракте микрометодом по Кьелдалю: В коническую пробирку для центрифугирования объемом в 10 мл пипеткой переносится 0,5 мл экстракта. Белки осаждаются одним миллилитром 20% трихлоруксусной кислоты и центрифугируется в малой настольной центрифуге. Супернатант, содержащий кроме прочего, также не белковый азот, тщательно сливается и осадок белков на дне пробирки растворяется в 1 мл 0,25 н NaOH. Так как осадок растворяется медленно, необходимо его перемешивать. Раствор затем переносится в банки для сжигания. В дальнейшем поступают обычным способом. Каждое определение производится в двух повторностях.

В нашей работе мы пользуемся физиологическим раствором по Рунге (Runge 1952), который обладает лучшими буферными свойствами, чем обычно применяющийся буферный физиологический раствор (состав раствора Рунге: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ — 3,95 г, KH_2PO_4 — 0,76 г, NaCl — 7,20, дестиллированная вода — до 1 литра).

При приготовлении экстрактов к раствору прибавляется еще 5% фруктозы. Этим повышается осмотическое давление раствора почти в два раза, зато, однако, этим достигается значительно большая устойчивость и способность к хранению белковых экстрактов, которые в замороженном состоянии сохраняются в течении ряда дней (иначе они не способны к хранению вследствие присутствия протеолитических ферментов и микроорганизмов) и которые без стабилизации добавленной фруктозой быстрее

денатурировались бы даже в замороженном состоянии. Таким образом были использованы данные, полученные при изучении морозостойкости растительных белков (Ulrich и Serber 1958), согласно которым фруктоза является самым эффективным из сахаров. Наши проверки указали, что прибавление фруктозы не влияет на способность раствора экстрагировать белки. Стабилизирующее действие фруктозы изображено на графике № 1 (применялись экстракты из ростков фасоли — *Phaseolus vulgaris* L. сорт Сакса).

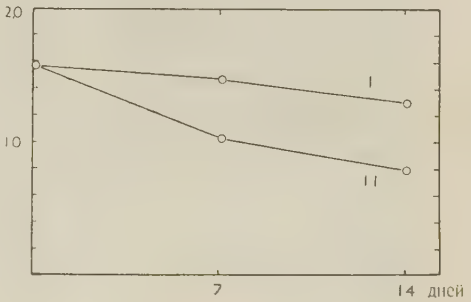


График № 1. Пример стабилизирующего действия фруктозы на раствор растительных белков, экстрагированных из проростков фасоли и содержавшихся при —20° С. На оси абсцисс — количество белкового азота в мг/1 мл раствора. На оси ординат — время в днях. I Экстракт в физиологическом растворе с 5% фруктозы. II Экстракт в физиологическом растворе без фруктозы. Экстракты хранились в замороженном состоянии при —20° С и через каждые 7 дней они размораживались, путем центрифугирования очищались от белков, выпавших в осадок вследствие денатурации, и в супернатанте определялось количество белкового азота. Из графика вытекает, что в растворах без прибавления фруктозы белки быстрее подвергаются денатурации.

Растительные белки экстрагируются физиологическим раствором относительно хорошо, за исключением некоторых запасных белков из семян. При ориентировочном опыте удавалось нам из «ацетонных препаратов» ростков пшеницы экстрагировать физиологическим раствором 69,8% общего азота, причем остающийся азот, не перешедший в раствор, большей частью вообще не удается экстрагировать без применения более грубых методов.

В белковых экстрактах из некоторых органов растений (как правило, например, в экстрактах из листьев) появляются меланины, вызывающие почернение экстрактов в присутствии воздушного кислорода. Если присутствие меланинов в дальнейшей работе мешает, то их образование можно тормозить прибавлением к физиологическому раствору аскорбиновой кислоты еще до экстрагирования растительного материала (см. также Rohringer и Stahmann 1958). Нами было установлено, что аскорбиновая кислота в концентрации 40—50 мг/% обладает уже сильными восстановительными свойствами, не влияя сколько нибудь существенно на pH физиологического раствора Рунге. Кроме того ставились опыты с целью выяснения влияния аскорбиновой кислоты на ход реакции между антигеном и антителами. Суммы данных по помутнению были во всех повторностях сходны с контролем (23,96 и 23,91). Однако, ход кривых реакции несколько отличался. Из сказанного следует, что применение аскорбиновой кислоты полезно, но оно должно быть строго стандартным при всех частных приемах в течении всего опыта.

Рис. 1. Прибор для измерения степени мутности серологических реакций: налево гальванометр, посредине фотронрефлектометр, направо штатив с кюветами.

Белковые экстракты помещаются в закрытые пробирки в количестве необходимом для одной иммунизации и хранятся в замороженном виде. При помощи этих белковых экстрактов производится внутривенная иммунизация по обычному методу. В одну инъекцию кролик среднего веса (2,5 -3 кг) получает около 10 мг белков. К концу иммунизации это количество удваивается и, наконец, даже утраивается (последнее касается в особенности так называемых конституционных белков из листьев или ростков, которые являются менее активными антигенами, чем белки из семян). Как правило, мы даем кроликам 12—14 инъекций в течении 4—5 недель. Очень полезным оказалось включение в схему иммунизации нескольких инъекций с прибавкой adjuvants ($AlCl_3$), что значительно повышает титр сывороток.

После указанной серии инъекций предварительно определяется титр антител в сыворотке при помощи микрометода кольцевой преципитации. Для этой цели из ушной вены кролика берутся образцы крови объемом почти в 1 мл, из которых после осаждения получаются небольшие количества сыворотки, с которой производится тест (к неразбавленной сыворотке прибавляется гомологичный антиген, разбавляемый в геометрической прогрессии; измерение производится через 20 минут и таким образом определяется крайнее разбавление антигена, при котором еще происходит положительная реакция). В случае достаточно высокой степени крайнего разбавления, дающего положительную реакцию (лучше всего 1 : 32 000), из организма голодных кроликов через 7—10 дней после последней инъекции путем сердечной пункции выводится вся кровь. Для этой цели кролики наркотизируются 1% ным тиопенталом (2 мл на 1 кг живого веса). От каждого кролика получается, как правило, 85—90 или больше миллилитров крови, из которой после осаждения получается в среднем 40—45 мл сыворотки (около 47% всего объема крови). После центрифугирования при 3000 оборотах (1700 g) сыворотка фильтруется с помощью фильтра Зейтца через вкладыш ЕК. Сыворотки окрашены

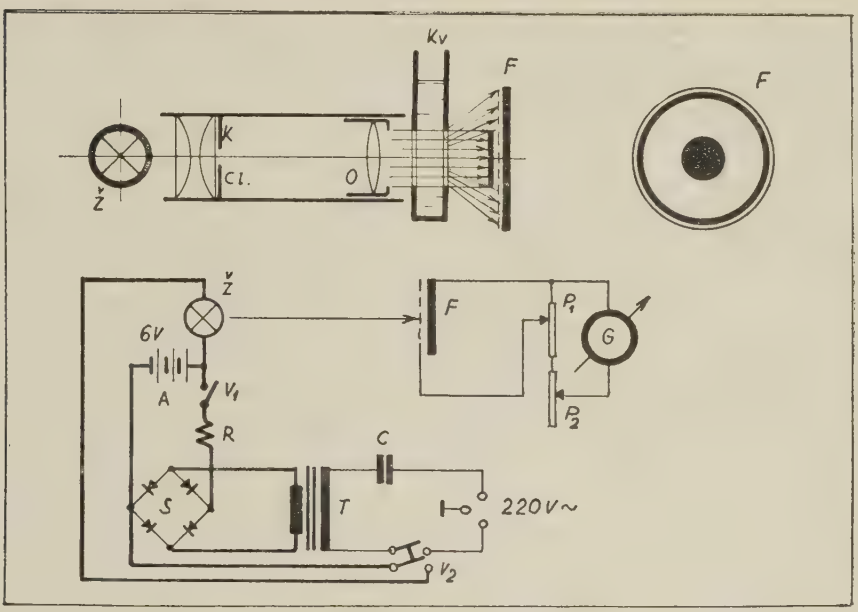


Рис. 2. Схема фотронрефлектометра со стабилизирующей и регулирующей установками. Объяснение см. в тексте. Ž — цилиндрическая лампочка, 6 вольт, 5 ватт. K — конденсор, O — объектив, Cl — диафрагма, Kv — кювета, F — селеновый фотоэлемент с запирающим слоем, A — мотоциклетный аккумулятор, 6 вольт, 7 амперчас, V_1 — выключатель с рычажком V_2 — двойной выключатель, R — сопротивление, 3 ома, 1,5 ампер для юстировки, S — селеновый выпрямитель T — трансформатор 220/8 вольт, 15 вольтампер, C — конденсатор 1 микрофараг/1000 вольт, P_1 — потенциометр 1000 ом, P_2 — потенциометр 200 ом G — гальванометр.

в желтоватый цвет: в случае, когда не удалось полностью избежать гемолиз, они красноваты, что, однако, не имеет никакого значения. Сыворотки высушиваются взамороженном виде, растираются в порошок и хранятся в свободно закрытых пузырьках в вакууме в эксикаторе примерно при +3 °C. Такие сыворотки можно годами хранить без потери титра. Для серологических реакций из порошков перед употреблением приготовляются 7%-ные растворы в дистиллированной воде. Последние еще центрифугируются в течении 20 минут при 15 000 g, распределяются по 5 мл в отдельные пробирки и хранятся при —20° C. Более подробные данные о технике иммунизации, получении сыворотки и т. д. можно найти, например, в следующих работах: Boyd 1956, Kabat и Mayer 1948, Carpenter 1958 и др.

Количественное определение серологических реакций проводим по методу Либби, разработанному Бойденом и сотрудниками (Libby 1938a, b; Boyden 1942; Boyden и De Falco 1943; Boyden, Bolton и Gemeroy 1947; Leone 1949, Boyden 1954). Для этого необходим прибор, который Либби назвал «фотронрефлектометром» (этот прибор пока все еще является более подходящим для наших целей, чем другие типы нефелометров, так как он проще по устройству и достаточно чувствителен). Принцип прибора показан на верхней части схемы на рис. 2. Модель применявшегося нами прибора изображена на рис. 1 и 2.

Прибор состоит из двух самостоятельных частей: из стабилизатора напряжения в электрической сети, и источника света в виде цилиндрической лампочки мощностью в 5 ватт для 6 вольт напряжения и второй части — собственно фотронрефлектометра с потенциометрами для настройки и с зажимами.

Обе части соединены при помощи четырех винтов так, что между ящиками имеется щель, заполненная воздухом, что очень важно для предохранения кюветы от вредного воздействия тепла, источником которого являются, главным образом, электрическая лампочка и трансформатор.

Источником стабилизированного тока напряжением в 6 вольт для проекционной лампочки Ž является трансформатор, к которому последовательно присоединен конденсатор 1 микрофарад/1000 вольт. Эта установка стабилизирует ток на ±3%. Чтобы добиться почти абсолютной стабилизации напряжения для лампочки Ž, ток выпрямляется еще при помощи селенового выпрямителя S, к которому через сопротивление для юстировки R присоединен маленький мотоциклетный аккумулятор A с напряжением на электродах в 6 вольт и емкостью в 7 амп/час. При пользовании прибором аккумулятор непрерывно заряжается током 0,3 ампер. Двойной выключатель V_2 служит для выключения питания от электрической сети или, если работа проводится в полевых условиях, от батареи. Выключатель V_1 служит для выключения стабилизатора на случай, когда прибор питается только от батареи. Весь стабилизатор вместе с лампочкой легко доступен, если снять одну половину крышки футляра.

Вторая часть прибора состоит из ящика со скошенной передней стенкой, в которой помещаются потенциометры P_1 для грубой настройки (сопротивление в 1000 ом) и P_2 для точной настройки (сопротивление 200 ом). Потенциометры присоеденены для настройки тока к фотоэлементу с запирающим слоем диаметром 50 мм и к гальванометру нормального типа (в данном случае к гальванометру «Интерфлекс» чехословацкого производства с постоянной $1{,}2 \times 10^{-8}$ А/мм/м). На скошенной части ящика помещаются также оба выключателя V_1 и V_2.

Источником света является лампочка Ž для тока 6 вольт с цоколем Свана, который можно точно центрировать вдоль оптической оси прибора. Конденсор K находится в тубусе, в котором передвигается объектив O. За конденсором расположена диафрагма Cl, которая проецируется объективом O через кювету Kv на фотоэлемент F. Полученный пучек лучей является параллельным, и изображение диафрагмы в виде светлого кружка имеет резкие очертания. Центр фотоэлемента закрыт темным кружком, так что остающаяся площадь чувствительна только к лучам рассеянного света. Фотоэлемент можно при помощи затененного кружка настроить на параллельные лучи.

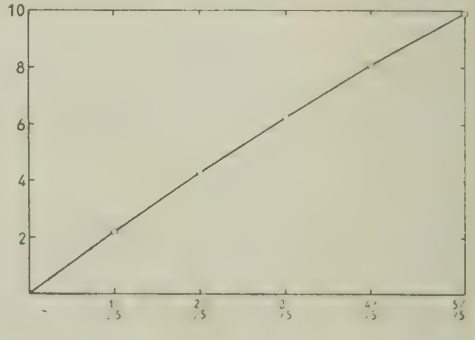


График № 2. Кривая каллибрации фотронрефлектометра (прибор на рис. 1 и 2) при помощи суспенсии $BaSO_4$. Более подробное объяснение дано в тексте. На оси абсцисс — данные измерений при помощи турбидиметра (фотронрефлектометра). На оси ординат — 5/5 = стандарт Мак-фарланда № 1 (суспенсия $BaSO_4$).

Считаю свои долгом высказать искреннюю благодарность тов. Зденеку Кавану за технический проект и сборку прибора.

Чувствительность прибора настраивается так, чтобы стандартное помутнение Мак-Фарланда № 1 (Mc Farland 1907) – получается путем смешения 99 мл 1%-ного раствора H_2SO_4 1 мл 1%-ного раствора $BaCl_2$) соответствовало показателю 10,00 на гальванометре. На графике № 2

даны показания гальванометра в зависимости от концентрации $BaSO_4$ (измерения проводились при помощи прибора изображенного на рис. 1 и 2: применялись кюветки размером 19×47×5 мм).

Далее будут коротко описаны приемы количественной оценки серологических реакций.

В пробирках размером в 11×90 мм антиген разбавляется в геометрической прогрессии так, чтобы в каждой последующей пробирке при объеме жидкости в 1,8 мл, концентрация в два раза уменьшалась; начиная с разбавления 1 : 500 и кончая 1 : 512 000 (11 пробирок). Считаю вполне обоснованным применение сухой пипетки при каждом последующем разведении антигена. Антиген разводится вышеописанным физиологическим раствором, но без фруктозы, присутствие которой во всех пробирках тормозило бы преципитацию примерно на 30%. Было также установлено, что несколько завышенное количество фосфатов в физиологическом растворе Рунге не оказывает на преципитацию (количество и величину зерна закала) никакого влияния. Теперь у всех степеней разведения измеряется начальное помутнение, пробы переливаются обратно в пробирки и в каждую из них прибавляется по 0,2 мл сыворотки (мы пользуемся соотношением 1,8 мл антигена + 0,2 мл сыворотки, в отличие от Бойдена, который работает с 1,7 мл антигена + 0,3 мл сыворотки, так как при достаточно высоком титре и при нижеприведенных обстоятельствах данное соотношение вполне достаточно и расход ценной сыворотки ниже). Смесь антигенов всех степеней разбавления с сывороткой инкубируется в течении 1 часа в водяной бане при 23° С, (в отличие от 20 минут инкубации при 37° С по Бойдену). Это делается вследствие того, что пробирки при переносе из лабораторных условий в баню или термостат с температурой в 37° С согреваются медленно. Кроме того, требуется также некоторое время для переливания содержимого пробирок в кюветы для проведения измерения. Таким образом получается лучшая стандартизация условий инкубации и всей работы в целом. Проверка проводилась с глицинином (глобулин из семян сои) и с соответствующей гомологичной сывороткой против глицинина. Инкубация проводилась при 23° С, помутнение после преципитации измерялось через 20, 40 и 60 минут. Результаты измерений приведены в таблице № 2.

Средняя методическая ошибка при измерении через 20 минут: ±5,98%, средняя квадратическая ошибка: ±0,8618.

Средняя методическая ошибка при измерении через 40 мин.: ±2,46%, средняя квадратическая ошибка: ±0,6038.

Средняя методическая ошибка при измерении через 60 мин.: ±2,91%, средняя квадратическая ошибка: ±0,6836.

Из приведенного следует, что средняя ошибка со временем уменьшается и что инкубация продолжительностью в 1 час годится также для более медленно протекающих реакций, чем рассмотренная. Кроме того это удобно в чисто техническом отношении.

Примечание: В рамках данного опыта исследовалось также влияние другого порядка разбавления: наряду с прогрессией 1 : 1000, 1 : 2000 . . . 1 : 512 000 (в данном случае мы начинали именно с 1 : 1000) та же реакция проводилась с антигеном, раз-

Таблица 2

№ реакции	Данные измерений через 20 мин.	Отклонения от среднего в %% (12,53 = = 100%)	Данные измерений через 40 мин.	Отклонения от среднего в %% (18,01 = = 100%)	Данные измерений через 60 мин.	Отклонения от среднего в %% (20,68 = = 100%)
1	12,86	+2,63	17,65	—2,00	19,71	—4,69
2	13,27	+5,90	18,09	+0,45	20,02	—3,19
3	12,21	—2,55	17,83	—1,00	21,22	+2,61
4	13,71	+9,67	18,89	+4,89	21,47	+3,82
5	13,64	+8,86	19,15	+6,33	21,52	+4,06
6	12,91	+3,04	18,12	+0,61	21,14	+2,22
7	11,21	—10,53	17,21	—4,44	19,84	—4,06
8	11,90	—5,03	18,01	0,0	21,06	+1,84
9	11,86	—5,35	17,51	—2,77	20,39	—1,40
10	11,75	—6,22	17,62	—2,16	20,43	—1,21

бавленным в прогрессии 1 : 1500, 1 : 3000 . . . 1 : 768 000. Во втором случае результаты измерений через 20, 40 и 60 минут соответственно равны 11,57, 17,65 и 20,15 и, следовательно, не выходят за пределы методической ошибки. Из данного примера ясно следует, насколько выгодна оценка по сумме данных всей кривой, как это рекомендует Бойден. Кроме того необходимо заметить, что с нормальной сывороткой неиммунизированного кролика глицинин практически не реагировал и что сыворотка против глицинина практически не давала реакции с отличающимся в химическом отношении кристаллическим белком из семян фасоли — фазеолином.

После одночасовой инкубации в каждой пробирке при помощи фотронрефлектометра измеряется степень преципитации. Вычитаются данные по начальному помутнению одинокого антигена и помутнению одинокой сыворотки в физиологическом растворе. Получается типичная кривая преципитации, ход которой лучше всего характеризует реакцию в целом

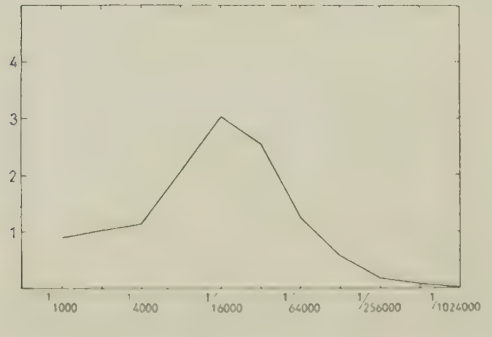
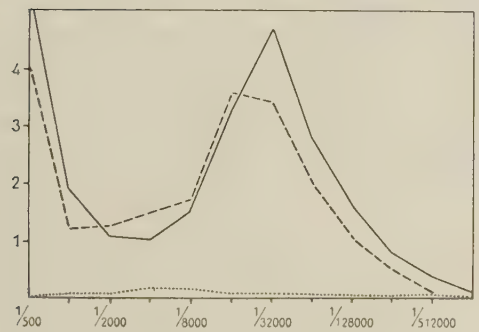


График № 3. Типичная кривая преципитации (растворы растительного антигена, разбавленные в геометрической прогресии, смешивались с неразбавленной гомологичной сывороткой). Объяснения см. в тексте. На оси абсцисс — данные измерений при помощи турбидиметра. На оси ординат — степень разведения антигена.

и которая не может быть заменена каким нибудь одним измерением даже в зоне эквивалентности, как это делают некоторые авторы. Типичная кривая преципитация изображена на графике 3 (на основании данных из таб. 2 по измерению реакции № 1 через 20 минут).

График № 4. ———— гомологичная реакция: сыворотка против белков из семядолей *Phaseolus vulgaris* L. × белки из семядолей этого же вида. — — — гетерологичная реакция: та же сыворотка × белки из семядолей *Phaseolus coccineus* L. . . . . гетерологичная реакция: та же сыворотка × белки из семядолей сои *Glycine soja* (L). Sieb. Zucc. На оси абсцисс — данные измерений при помощи турбидиметра. На оси ординат — степень разведения антигена.



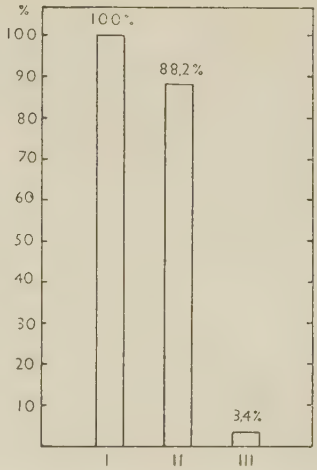


График № 5. Изображение данных из графика № 4 в виде столбиковой диаграммы: I Сыворотка против белков из семядолей *Phaseolus vulgaris* L. × белки из семядолей этого же растения. II Та же сыворотка × белки из семядолей *Phaseolus coccineus* L. III Та же сыворотка × белки из семядолей *Glycine soja* (L). Sieb. Zucc.

Мы видим, что в условиях относительного избытка антигена реакция ингибируется. По мере приближения к оптимальным соотношениям между антигеном и антителами из сыворотки степень преципитации усиливается и затем, по мере нарастания относительного избытка антител реакция слабеет и исчезает при крайнем разбавлении антигена. Ход этой кривой относительно объективно характеризует активность реакции между антигеном и антителами. Площадь под кривой является количественным выражением для этой активности. В случае гомологичных реакций эта площадь больше: в случае гетерологичных реакций она пропорциональна степени химического родства (т. е. степени сходства или различия детерминирующих групп) изучаемого антигена с антигеном, который был использован для иммунизации. Однако, на практике это верно лишь с некоторыми ограничениями. Вместо измерения площади под кривой для количественной характеристики реакции складываются все данные по турбидиметрическим измерениям всего ряда, так как эта сумма при одинаковом графическом изображении прямо пропорциональна площади под кривой. Началом реакции считается самая низкая точка на стороне относительного избытка антигена и концом — исчезновение реакции на стороне относительного избытка антител. При этом необходимо отметить, что в нашей работе, в особенности в случае растительных антигенов, начало реакции не находится на оси абсцисс. В этом наши графики отличаются от графиков школы Бойдена, которая в качестве антигенов пользуется преимущественно белками из кровяной сыворотки животных.

При сравнении степени сходства или отличия, результат гомологичной реакции ставится равным 100% и результаты гетерологичных реакций приводятся в %% от первой. При нормальной работе помутнение измеряется два раза, в двух параллельных повторностях, причем далее высчитывается среднее по обоим измерениям.

На графике № 4 изображена одна гомологичная реакция (между сывороткой против антигенного комплекса семядолей обычной фасоли *Phaseolus vulgaris* L. сорт Сакса и соответствующими антигенами) и две гетерологичных реакции (в первом случае между сывороткой против антигенного комплекса семядолей *Ph. vulgaris* сорта Сакса и комплексом антигенов семядолей *Phaseolus coccineus* L.; во втором случае была применена та же сыворотка и комплекс антигенов из семядолей сои *Glycine soja* (L). Sieb. Zucc.). На графике № 5 изображена количественная сторона этих реакций. Мы видим, что имеются отчетливые различия между видами *Phaseolus vulgaris* L. и *Ph. coccineus* L. и что имеются резкие различия между родами *Phaseolus* и *Glycine*. В случае кривой реакции с антигенами из *Phaseolus vulgaris* L. и *Ph. coccineus* L. бросается в глаза более интенсивное помутнение в условиях более высокой концентрации антигена в левой части кривой. Это вызвано неспецифическими преципитинами, присутствующими в семядолях растений этих двух видов. Эта неспецифическая часть реакции протекает одинаков отакже при прибавлении нормальной сыворотки кролика. (При указанных условиях экстрагирования и при указанной степени разведения антигена неспецифические преципитины у сои сорта Итальянская Няве отсутствуют). Неспецифическая часть реакции совсем отчетливо отделена от специфической (максимум последней у *Ph. vulgaris* приходится на разведение антигена в отношении 1 : 32 000, у *Ph. coccineus* соответственно на 1 : 16 000).

Преимуществом описанного в данной статье способа оценки реакций является, следовательно, также и то, что этим путем удается обнаружить неспецифические реакции, вызванные связыванием нормальных гликопротеидов кровяной сыворотки неспецифическими белковыми преципитинами некоторых растений и, вместе с тем, четко их отграничить от специфических реакций, обусловленных связью между антителами сыворотки, выработанными в ходе иммунизации и соответствующими антигенами.

Можно еще отметить, что специфичность сыворотки.можно существенно повысить путем адсорбции. Для этих целей лучше всего подходит метод Дунина, при котором нет необходимости в снижении титра сыворотки. Дунин адсорбирует антиген гетерологичной сывороткой и после центрифугирования производит иммунизацию (см. Дунин и Попова 1937, цитировано по Jermoljev и Hruška 1947, где метод также описывается).

Описанный метод количественной оценки серологических реакций несмотря на свою практичность, является достаточно объективным и точным, относительно быстрым и отличается относительно малым расходом сыворотки. Условием является тщательная и стандартная работа: в этом случае средняя методическая ошибка не превышает ± 3%.

Разработанные методы позволяют заниматься решением ряда важных проблем из области генетики и физиологии растений, не говоря уже о вопросах, связанных с изучением эволюции и таксономии растений.

Считаю долгом выразить благодарность тов. Вере Турковой, Пром. биол., за инициативную техническую помощь при осуществлении этой работы.

Литература

Дунин, М. С., Попова, Н. Н.: Капельный метод анализа вирусов в растениеводстве. — Серия «Новое в сельском хозяйстве», вып. 13, 1937.

Розанова, М. А.: Экспериментальные основы систематики растений. — Москва—Ленинград, 1946.

Aach, H. G., Melchers, G.: Serologische Untersuchungen an kältebedürftigen Pflanzen [Серологические исследования на холодолюбивых растениях.] — Biol. Zbl. **76** : 466—475, 1957.

Baum, W. C.: Systematic serology of the family *Cucurbitaceae* with special reference to the genus *Cucurbita* [Систематическая серология семейства *Cucurbitaceae*, в особенности рода *Cucurbita*]. — Serolog. Museum Bull. **13** : 5—8, 1954.

Boyd, W. C.: Fundamentals of Immunology [Основы иммунологии].— New York, 1956.

Boyden, A. A.: Systematic serology: A critical appreciation Систематическая серология: критическая оценка]. — Physiol. Zool. **15** : 109—145, 1942.

Boyden, A. A.: The measurement and significance of serological correspondence among proteins (Измерение и значение серологического сходства между белками]. Сборник: Serological approaches to studies of protein structure and metabolism. — Rutgers university Press, New Brunswick, New Jersey, 1954.

Boyden, A. A.: Comparative serology: Aims, methods and results [Сравнительная серология: Цели, методы и результаты]. — Serolog. Museum Bull. 20, 2, 1958.

Boyden, A. A., Bolton, E. T., Gemeroy, D. G.: Precipitin testing with special reference to the photoelectric measurement of turbidity (Исследование преципитина с уделением особого внимания фотоэлектрическому методу измерения степени мутности]. — J. Immun. **57** : 211—227, 1947.

Boyden, A. A., De Falco, R.: Report on the use of the photronreflectometer in serological comparisons. [О применении фотронрефлектометра при сравнении серологических реакций]. — Physiol. Zool. **16** : 229—241, 1943.

Carpenter, P. L.: Immunology and serology (Иммунология и серология]. — Philadelphia-London, 1958.

Hammond, H. D. Systematic serological studies in Ranunculaceae. [Систематико-серологические исследования семейства лютиковых]. — Serolog. Museum Bull. **14** : 1—3, 1955a.

Hammond, H. D.: A study of taxonomic relationship within the *Solanaceae* as revealed by the photroner serological method (Исследование таксономических взаимоотношений, внутри сем. *Solanaceae*, вскрытых при помощи фотронового серологического метода]. — Serolog. Museum Bull. **14** : 3—5, 1955b.

Chester, K. St.: A critique of plant serology. (Критика серологии растений]. — Quart. Rev. Biol. **12** : 19—46, 165—190, 294—321, 1937.

Jermoljev, E., Hruška, L.: Serologická metoda určování virových chorob u bramborů [Серологический метод определения вирусных заболеваний картофеля]. — Sborník Výzkumných ústavů zemědělských RČS, 178, Praha 1947.

Kabat, E. A., Mayer, M. M.: Experimental Immunochemistry [Экспериментальная иммунохимия]. — Illinois, USA, 1948.

Kaminski, M., Williams, M. C.: Emploi des méthodes immunochimiques dans les études de systématique zoologique, d'embryologie et d'epidémiologie [Применение иммунохимических методов при исследованиях в области зоологической систематики, эмбриологии и эпидемиологии]. — J. de Médecine (Bordeaux) **130** : 291—299, 1953.

Johnson, M. A.: The precipitin reaction as the index of relationship in the *Magnoliaceae* [Реакция преципитации как показатель степени родства внутри сем. *Magnoliaceae*]. — Serolog. Museum Bull. **13** : 1—5, 1954.

Leone, Ch. A.: Comparative serology of some Brachyuran *Crustacea* and studies in hemocyanin correspondence [Сравнительная серология некоторых видов крабов и изучение сходства гемоцианина]. — Biol. Bull. **97** : 273—286, 1949.

Libby, R. L.: The photronreflectometer — an instrument for the measurement of turbid systems [Фотронрефлектометр — прибор для измерения мутных систем]. — J. Immunol. **34** : 71—73, 1938a.

Libby, R. L.: A new and rapid quantitative technic for the determination of the potency of types I and II antipneumococcal serum [Новый и быстрый количественный метод оп-

ределения потенции типов I и II противопневмококковой сыворотки]. — J. Immunol. **34** : 269—279, 1938b.

Mc Farland, J.: The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines [Нефелометр: прибор для приблизительного определения количества бактерий в суспенсиях, используемых для вычисления опсонического индекса и для вакцин]. — Jour. A. M. A. **5** : 1176—1177, 1907.

Metzner, H.: Veränderungen der Blattproteine bei photoperiodischer Induktion [Изменения белков листьев при фотопериодической индукции]. — Planta **45** : 493—534, 1955.

Moritz, O.: Die Serologie der pflanzlichen Eiweisskörper [Серология растительных белков]. Hdb. der Pflanzenphysiologie, Berlin-Göttingen-Heidelberg, Bd. VIII : 356—414, 1958.

Rohringer, R., Stahmann, M. A.: Immunochemical studies with tomato leaf proteins [Иммунохимические исследования белков из листьев томата]. — Science **127** : 1336—1337, 1958.

Runge, P. A.: Pharm. Acta Helvet. **72**, 315, 1952. Цит. по: Peach K., Tracey M. V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. 3, l. c. 71 [Современные методы анализа растений]. Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955.

Ulrich, H., Serber, V.: Über das Denaturieren pflanzlicher Eiweisse durch Ausfrieren und seine Verhinderung [О денатурации растительных белков вследствие вымерзания и ее предотвращении]. — Planta **51** : 399—413, 1958.

Адрес: Josef Kloz, Biologický ústav ČSAV, oddělení fysiologie rostlin, Praha-Dejvice, Na cvičišti 2.

BIOL. PLANT. 2 (1) : 27—42, 1960

Quantitative Assay of Serological Reactions by Measuring Turbidity in Comparative Plant Serology

Josef Kloz

Department of Plant Physiology, Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha

Summary

A technical procedure is described together with slight modifications and technical alternations, for the application of the quantitative serological method in work with labile plant proteins, particularly those from vegetative organs.

The procedure is based on the well-known method developed by Boyden et al., using Libby's "photronreflectometer". The results published here have been obtained in the course of the determination of applicability of the following modifications to a quantitative evaluation of serological reactions:

a) The use of "acetone preparations" in obtaining antigens: A single operation is sufficient to remove undesirable admixtures, such as lipids, organic acids, tannin, alkaloids etc., the antigenic activity of the protein material being preserved. The conservability of such material in a dry state is considerably increased (for a number of months) by this procedure.

b) Stabilization of solutions of plant antigens of adding 5% fructose: The denaturation of plant proteins in frozen solutions is thus to a high degree prevented and their applicability is prolonged for a number of days.

c) A modification of incubation period and temperature during quantitative precipitation in order to ensure a more precise standardizing of the experimental conditions, with simultaneous decreasing of the antiserum doses.

d) Standardization of the calibrating process of Libby's "photronreflectometer".

e) Application of Runge's physiological solution; addition of ascorbic acid to prevent melanin formation in antigen extracts from plant material.

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

2 (1) : 43—47, 1960

The Effect of Gibberellic Acid on the Dynamics of Chlorophyll Synthesis in Etiolated Seedlings

Zdeněk Šesták and Jaroslav Ullmann

Department of Plant Physiology, Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha

Received May 30, 1959

Souhrn

Osmidenní klíční rostlinky pšenice a kukuřice, pěstované ve tmě v Knopově živném roztoku, ke kterému bylo v pokusné variantě přidáno 10 μg/ml kyseliny giberelové (GA), byly osvětleny světlem zářivek o intensitě 3000 lux. V časových intervalech 0, 3, 6, 9, 12 a 24 hodin bylo kolorimetricky stanoveno množství chlorofylu ($a + b$) v acetonových extraktech z vrcholových částí listů dlouhých 5 cm. Pokles množství chlorofylu o 23,3 až 42,8 % vlivem GA byl průkazný ve všech časových úsecích při přepočtu na váhu sušiny i na délkovou jednotku listu. Průběh křivek (obr. 1 a 2) ukazuje na snížení rychlosti tvorby chlorofylu v přítomnosti GA. Současně bylo pozorováno nižší množství karotenoidů u etiolovaných rostlin pěstovaných v roztocích GA než u kontrolních rostlin. Kolorimetrické stanovení pigmentů bylo doplněno papírovou chromatografií, která sloužila jako kontrola kvality a přibližného množství pigmentů.

Summary

Chlorophyll formation in etiolated seedlings of wheat and maize, grown for 8 days on Knop's nutrient solution with 10 μg. gibberellic acid (further GA) added per ml. was investigated and compared with control plants. Under the light of fluorescent tubes of an intensity of 3000 lux a significant decrease in the amount of chlorophyll ($a + b$) was observed at all time intervals from 0 to 24 hr., expressed both per dry weight and per leaf length. Experimental results indicate a decreased rate of chlorophyll formation in the presence of GA.

At the same time, a lower content of carotenoids was found in etiolated plants than in controls grown in absence of GA.

The colorimetric determination of the pigments was accompanied by paper chromatography which served as a control of quality and approximate amount of pigments.

Introduction

A number of authors have observed symptoms of chlorosis on the application of GA to plants, but the effect was studied quantitatively only in isolated cases. A decrease in the amount of chlorophyll due to gibberellin in young rice plants was found by YABUTA et al. (1951). Similarly ULLMANN and KREKULE (1958) determined quantitatively a decrease in chlorophyll content of lettuce seedlings grown on a nutrient medium containing 10 μg. GA/ml. Experimental plants contained 45% less chlorophyll per fresh weight and 30% less chlorophyll per dry weight, than the controls.

The submitted paper presents results of an attempt:

1. to obtain quantitative data about the decrease in chlorophyll content of monocotyledonous seedlings (wheat and maize) due to GA;
2. to determine the dynamics of chlorophyll formation in these plants during the first 24 hours of illumination;
3. to find out whether the amount of chlorophyll is decreased in relation to the fresh or dry weight of wheat and maize.

Material and Methods

Material. Wheat seeds (var. Chlumecká 12) and maize seeds (var. Lednický raný 1) were germinated and grown in the dark at 23° C on filter paper placed in Petri dishes containing a nutrient medium which was replaced every three days. Experimental plants were grown in Knop's nutrient solution containing 10 μg. GA/ml., control plants in Knop's solution alone. GA used was preparation of Plant Protection Ltd., England.

Experimental procedure. Petri dishes with eight-day-old etiolated seedlings in the first-leaf phase were transferred and uniformly distributed in a lighted chamber. TESLA B FU fluorescent tubes (white light, 25 W) were used to achieve a light intensity of 3000 lux (measured with a selenium photo-cell using a neutral filter) at 25—27° C. Samples for the determination of chlorophyll and of dry weight were removed after 0, 3, 6, 9, 12 and 24 hours. There were 20 experimental and 20 control plants of wheat or 6 experimental and 6 control plants of maize, from which 5 cm. long tips of the first leaf were always removed.

Determination of chloroplast pigments: Fresh material was submerged in anhydrous redistilled acetone immediately after sampling. The extraction was carried out after grinding the material with sand and solid $MgCO_3$. The filtered acetone extract (10 ml.) was measured on a Pulfrich photometer using a S 64 filter and 1 cm. cuvettes. Chlorophyll content was calculated from the extinction values by using a calibration curve of a mixture of standards of chlorophyll *a* and *b* (supplied kindly by Dr. E. WIEDEMANN, Basel, Switzerland) at a ratio of 3 : 1. On account of insignificant differences in the absorption of the two chlorophylls when the S 64 filter was used, the error of calculation of chlorophyll formation during the first hours of illumination is negligible. A differential analysis of carotenoids was carried out by using an S 47 filter. The determination of chlorophyll was supplemented with paper chromatography for the sake of controlling the quality and the approximate amount of pigments (cf. ŠESTÁK 1958). Chromatograms were developed unidimensionally in the ascending direction, using Whatman filter paper 3, in a solvent system according to HAGER (1955) and in a mixture toluene-methanol (400 : 1). Detection was carried out both in visible and ultraviolet light.

Dry-weight determination: Samples were dried at 105° C for 12 hours.

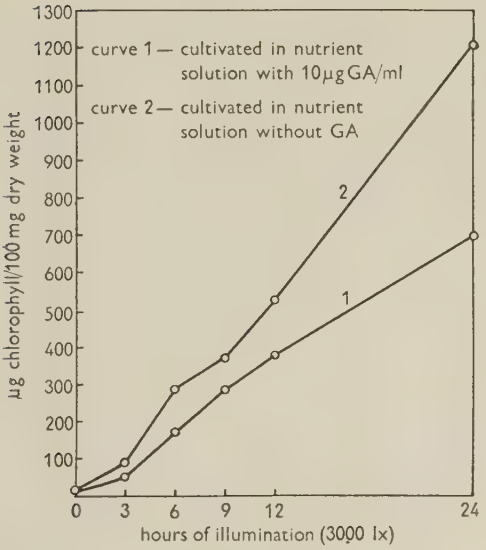
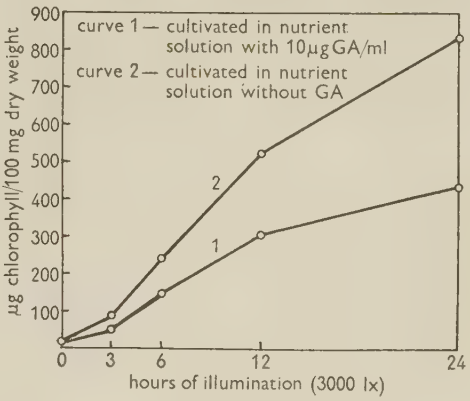


Fig. 1. Time curve of chlorophyll ($a + b$) formation in eight-day etiolated wheat seedlings.

Fig. 2. Time curve of chlorophyll ($a + b$) formation in eight-day etiolated maize seedlings.



Results

It follows from experimental results that etiolated wheat seedlings grown in a nutrient solution containing 10 μg. GA/ml. form less chlorophyll ($a + b$) than the controls during 24 hours of illumination. The time curve of chlorophyll formation is shown in Fig. 1.

The results shown represent a summary of two experiments. Thus the values are mostly averages of 4 samples of 20 plants each. The dry weight of sections does not change appreciably during illumination. No significant difference between weight averages of leaf sections in the two experiments could be detected ($\bar{x} \pm 3 \cdot s_{\bar{x}}$ in mg. dry weight: controls 55·2 $\pm$ 3 . 0·89 and 53·8 $\pm$ 3 . 1·01, experimental plants with GA 44·4 $\pm$ 3 . 0·56 and 43·2 $\pm$ 3 . 0·72). Therefore, both experiments were evaluated simultaneously and the amount of chlorophyll expressed per total average amount of section dry weight. The differences between leaf section dry weights of the control and of the experimental series are significant to very significant (Table 1).

Table 1. Statistical evaluation of the dynamics of chlorophyll ($a+b$) formation in wheat seedlings treated with gibberellic acid (10μg./ml.) during illumination with 3000 lux

Duration of illumination	Amount of chlorophyll in μg./100 mg. dry weight $\bar{x} \pm 3 \cdot s_{\bar{x}}$		Decrease in chlorophyll content in experimental plants (in % of control)	Significance of the difference in chlorophyll content in experimental and control-plants
	Control	GA		
3	91 $\pm$ 3 . 8·3	52 $\pm$ 3 . 2·6	42·8%	$P = 0{\cdot}05$
6	287 $\pm$ 3 . 6·7	173 $\pm$ 3 . 4·4	39·7%	$P < 0{\cdot}001$
9	369 $\pm$ 3 . 5·2	283 $\pm$ 3 . 9·0	23·3%	$P < 0{\cdot}01$
12	526 $\pm$ 3 . 10·3	378 $\pm$ 3 . 29·2	28·1%	$P < 0{\cdot}01$
24	1211 $\pm$ 3 . 32·6	697 $\pm$ 3 . 14·6	42·4%	$P < 0{\cdot}001$

Analogous results were obtained with maize seedlings, as shown in Fig. 2.

A check-up measurement of extracts of etiolated seedlings after several hours of illumination, using the S 47 photometer filter, revealed a marked decrease in carotenoid content (by c. 30 to 40%) in wheat and maize seedlings treated with GA.

The determination of chlorophyll was accompanied by semi-quantitative paper chromatography which showed that even prior to illumination etiolated control and experimental plants contained trace amounts of chlorophylls *a* and *b*. The ratio of chlorophyll *a* to *b* was not appreciably changed by GA. GA markedly decreased the amount of chlorophyll, as revealed by the location and density of spots. Chromatographic analysis revealed the same qualitative composition of carotenoids (one spot of carotene and four spots of xanthophylls) but their total amount was significantly lower in GA-treated plants.

Discussion

GA-induced plant chlorosis, observed by a number of authors, quantitative results obtained with lettuce seedlings (Ullmann and Krekule 1958) and results presented in this paper for wheat and maize seedlings, show that the decrease in chlorophyll content is absolute, i. e. per unit dry weight.

The time curve of chlorophyll formation in etiolated plants grown in the presence of GA (Figs. 1 and 2) suggests an effect on the rate of chlorophyll synthesis, which is in agreement with the theoretical postulate of Stove and Yamaki (1957). The presence of trace amounts of both chlorophylls prior to exposure to light can be explained by a fast rate of conversion of protochlorophyll to chlorophyll (Rabinowitch 1956, p. 1761) during removal of samples for extraction. Thus it appears that GA causes practically no inhibition of protochlorophyll formation in the dark. The limitation of the rate of chlorophyll synthesis during following time intervals is probably caused by a lack of basic precursors of plant pigments which are preferentially utilized for the make-up of structural elements of the plant organism during the more rapid growth of stimulated plants. The above assumption is supported by an investigation of carotenoid content in wheat and maize seedlings grown in GA, which provides evidence against the effect on chlorophyll formation being exceptional. This statement is in agreement with the data of Brian et al. (1954) and with field experiments of Wittwer and Bukovac (1957), Morgan and Mees (1958) and with the patent ICI (1955), in which the possibility was shown of suppressing slight chlorotic symptoms by increased fertilization and nutrition of GA-stimulated plants.

Temperature and light intensity during experiments were optimal with respect to chlorophyll synthesis (Gyubbenet 1951, p. 124).

The slight decrease and further increase of chlorophyll formation during the first hours of illumination (Table 1), which is quite marked in the control plants and was described also by other authors (Tolbert and Gailey 1955), can be explained by a retarded onset of synthesis of chlorophyll *b* as compared with that of chlorophyll *a*, as follows, for instance, from the paper of Blaauw-Jansen at al. (1950).

References

Blaauw-Jansen, G., Komen, J. G., Thomas, J. B.: On the relation between the formation of assimilatory pigments and the rate of photosynthesis in etiolated oat seedlings. — Biochim. biophys. Acta **5** : 179—185, 1950.

Brian, P. W., Elson, G. W., Hemming, H. G., Radley, M.: The plant-growth-promoting properties of gibberellic acid, a metabolic product of the fungus *Gibberella fujikuroi*. — J. Sci. Food Agric. **5** : 602—612, 1954.

Gyubbenet, E. R.: Rastenie i khlorofill [Plant and chlorophyll]. — Izdat. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1951.

Hager, A.: Chloroplasten-Farbstoffe, ihre papierchromatographische Trennung und ihre Veränderungen durch Aussenfaktoren. — Z. Naturforsch. **10**b : 310—312, 1955.

Imperial Chemical Industries, Ltd. Patent Q 11504 A/11656 A (Australia 28. 6. 1955).

Morgan, D. G., Mees, G. C.: Gibberellic acid and the growth of crop plants. — J. agric. Sci. **50** : 49—59, 1958.

Rabinowitch, E. I.: Photosynthesis and related processes. Vol. II, part 2. Interscience Publishers, New York, 1956.

Šesták, Z.: Paper chromatography of chloroplast pigments. — J. Chromatography **1** : 293—308, 1958; Chromatographic Reviews **1** : 193—208, 1959.

Stove, B. B., Yamaki, T.: The history and physiological action of the gibberellins. — Ann. Rev. Plant Physiol. **8** : 181—216, 1957.

Tolbert, N. E., Gailey, F. B.: Carbon dioxide fixation by etiolated plants after exposure to white light. — Plant Physiol. **30** : 491—499, 1955.

Ullmann, J., Krekule, J.: The influence of gibberellic acid on the chlorophyll content of germinating lettuce plants. — Folia biol. (Praha) **4** : 251—252, 1958.

Wittwer, S. H., Bukovac, M. J.: Gibberellin and higher plants. V. Promotion of growth in grass at low temperatures. — Quart. Bull. Michigan agric. Exp. Sta. **39** : 682—686, 1957.

Yabuta, T., Sumiki, Y., Fukunaga, K., Horiuchi, M.: Biochemical studies of bakanae fungus. XXII. Chemical composition of rice seedlings treated with gibberellin. — J. agr. chem. Soc. Japan **24** : 396—397, 1951. Cit. Chem. Abstr. **46** : 5143f, 1952.

Address: Zdeněk Šesták, Prom. Biol., Biologický ústav ČSAV, odd. fysiologie rostlin, Praha-Dejvice, Na cvičišti 2.
Jaroslav Ullmann, Prom. Chem., Výzkumný ústav ovocnářský ČSAZV, Holovousy, p. Ostroměř, Czechoslovakia.

BIOL. PLANT. 2 (1) : 43—47, 1960

Влияние гиббереллиновой кислоты на биосинтез хлорофилла в этиолированных проростках

ЗДЕНЕК ШЕСТАК и ЯРОСЛАВ УЛЛМАНН
Отдел физиологии растений Биологического института ЧСАН, Прага

Резюме

Восьмидневные проростки пшеницы и кукурузы, которые выращивались в темноте на питательном растворе Кнопа, содержавшем 10 микрограммов гиббереллиновой кислоты, освещались люминисцентными лампами мощностью в 3000 люксов. Регулярно через 0, 3, 6, 9, 12 и 24 часа колориметрическим методом определялось количество хлорофилла (a + b) в ацетоновых экстрактах из верхушечных частей листьев 5 см длиной. Во всех указанных промежутках времени после начала опыта можно было наблюдать снижение содержания хлорофилла под влиянием ГК по отношению к сухому весу и к единице длины листа. Ход кривых (рис. 1 и 2) свидетельствует о снижении скорости образования хлорофилла в присутствии ГК. Одновременно наблюдалось пониженное содержание каротиноидов в этиолированных растениях, выращиваемых в растворах, содержащих ГК, по сравнению с контролем. Наряду с колориметрическим определением пигментов проводилось также их определение методом бумажной хроматографии, послужившее контролем качества и примерного содержания пигментов.

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

2 (1) : 48—60, 1960

Über die Wechselwirkung der Gibberellinsäure und anderer Stimulatoren in den Wachstumskorrelationen

Rudolf Dostál

Botanisches Institut der landwirtschaftlichen Hochschule Brno

Eingegangen am 13. Juni 1959

Souhrn

Práce shrnuje výsledky morfologických pokusů, řešících především uplatnění giberelové kyseliny (GS) v korelacích růstu a vývoje rostlin a s tím souvisící možnost zdolat látkami tohoto druhu vlivy omezující růst a produktivnost rostlin, tak zjevně vynikající zvláště u dřevin. Experimentováno bylo s běžnými modelovými rostlinami, vhodně upravenými tak, aby se tyto složité vztahy pokud možno zjednodušily: s klíčními rostlinami hrachu a lnu, s klíčky bramborů, s letorosty šeříku, s osními úseky a s hlízami planě rostoucích rostlin (krtičníku, čarovníku a orseje) a s *Bryophyllum*. GS byla aplikována většinou lokálně ve formě lanolinové pasty 0,5%. Ukázalo se, že do korelací zasahuje tak, že zeslabuje inhibiční vliv asimilujících listů a vegetativních rezervních orgánů a v tom směru do jisté míry nahrazuje stimulační vliv kořenů, avšak nikoli bez běžně známých deformací a bez poruch výživy, prozrazujících se nekrobiozou vrcholků. Do poměrů dominance mezi pupeny nelze pomocí GS zasahovat, podobně jako ani do základního regulačního vlivu listů a děloh, v čemž se její vliv podstatně liší od vlivu β-indolyloctové kyseliny (IES). Rovněž nemění korelací určujících embryonální zakládání orgánů v zimních pupenech. Na tvorbu hlíz pro nadměrnou aktivaci jejich terminálního pupenu působí nepříznivě. Tvorbu květů u *Bryophyllum crenatum*, rostliny dlouhokrátkodenní, umožní GS pouze v kultuře v krátkém dni, zřejmě v důsledku fylogenetického přizpůsobení na tropy. Přenesou-li se krátkodenní růžice po aplikaci GS hned na dlouhý den, nekvetou stejně, jako nekvetou dlouhodenní exempláře bez GS i s GS. V práci jsou zmínky i o interakci s IES, trijodbenzoovou kyselinou (TIBA), maleinhydrazidem (MH) a j. v korelacích růstu.

Zusammenfassung

Weder die Dominanzverhältnisse zwischen den Sprossanlagen noch die Regulationswirkungen der Laub- und Keimblätter, die unter anderem für die vorzeitige Wachstumssistierung namentlich bei den Holzgewächsen verantwortlich sind, lassen sich durch Gibberellinsäure verändern. Doch setzt GS

die von assimilierenden Blättern und vegetativen Speicherorganen ausgehenden Hemmungen herab und ersetzt in dieser Hinsicht die Stimulationswirkungen der Wurzeln, allerdings nur unvollständig, da es nachher zu den bekannten Ernährungs- und Gestaltungsstörungen kommt. Auf die Knollenbildung wirkt GS ungünstig, da die Terminalknospe der Knollenanlage zu starkem Streckungswachstum statt zu erforderlicher Ruhe gebracht wird. Die günstige Wirkung von GS auf die Blütenbildung bei der Langkurztagpflanze *Bryophyllum crenatum* tritt nur dann ein, wenn die mit GS behandelten Kurztagrosetten noch weiter im Kurztag gezogen werden. Somit kommt es hier mehr auf die phylogenetische Anpassung dieser Pflanzen an die Tropen, als auf gewisse stoffliche Einflüsse an, was mutatis mutandis auch von der Rhythmik der Bäume gilt.

Einleitung

Die experimentelle Erforschung der Wachstumskorrelationen setzt sich die Erklärung der Totalität der Pflanze zum Ziel. Die Erkenntnis der entsprechenden biologischen Mechanismen wäre ohne Zweifel auch für die Beherrschung der Formbildung der Kulturpflanzen von grossem Nutzen. Groben Vorstellungen über die Hauptrolle der üblichen Ernährung etwa nach Göbel, Klebs, Wiesner u. a. widersprechen die neuzeitlichen Erfahrungen, die man mit Wachstumsstimulatoren gemacht hat. Bereits Němec (1905) hat anlässlich seiner Studien über die Regeneration der Wurzelspitze auf die spezifische Natur der Wachstumsregulationen hingewiesen. So gelingt es jetzt auch, die Korrelation zwischen dem Keimblatt und seiner Achselknospe bei der Erbse *(Pisum sativum)* bereits nach Wanka (1929), Plch (1936), Dostál (1938), ebenso wie die Regulationswirkung der Laubblätter und vegetativen Speicherorgane (Havránek 1925, Uhrová 1934) durch geringe Mengen von IES nachzuahmen. Ähnlich haben Thimann und Skoog (1933, 34) die apikale Dominanz der Knospen der Erklärung näher gebracht, indem sie das Kotylarwachstum bei der Feldbohne *(Vicia faba)* durch Wuchsstoffbehandlung des dekapitierten Epikotyls verhinderten. Diese beiden für die Sprossentwicklung verantwortlichen Korrelationen lassen sich miteinander vergleichen, wenn an dekapitierten Erbsenkeimlingen eine Keimblattknospe der Wirkung exogener IES aus dem Epikotylstumpf und die andere Knospe aus einem der beiden in gleicher Weise zugeschnittenen Keimblätter ausgesetzt wird (Abb. 1a). Da die Knospe unter der Epikotylhälfte mit IES-Paste stärker heranwächst und das Wachstum der Gegenknospe, die durch das Keimblatt mit IES stärker gehemmt wurde, sistiert, kommt die primäre Rolle bei der Regulierung des Sprosswachstums den Keim- bzw. Laubblättern zu (Dostál 1959). Im Hinblick auf die öfters festgestellte Wechselwirkung von IES und GS lag die Frage nahe, wie sich der letztgenannte Stoff in den erwähnten Korrelationen auswirken wird, vor allem, ob sich mit seiner Hilfe die korrelative Dominanz zwischen den beiden gegenüberliegenden Kotylarknospen so ganz regelmässig induzieren lässt, wie durch exogene IES. Schon daraus könnte ein Schluss auf die Bedeutung von GS im Korrelationsgefüge der Pflanze gezogen werden.

Material und Methodik

Bei der Auswahl des Materials für die hier beschriebenen morphologischen Versuche wurden Pflanzen mit dekussierter Blattstellung vorgezogen, da sie einen besseren Vergleich des Verhaltens der Versuchs- und Kontrollteile ermöglichen. Es waren hier verschiedene Operationen notwendig, besonders um die Wachstumskorrelationen an verkleinerten Versuchsobjekten besser als an ganzen Pflanzen hervortreten zu lassen. Die dadurch gestörten Korrelationen wurden mit Hilfe von Stimulatoren untersucht, die sich in Form von Lanolinpasten besser als Lösungen zu lokaler Einwirkung eignen. Zur Kontrolle diente die Wasserpaste (Lanolin: Wasser 1 : 1), die auch zur Herstellung der verschiedenen Versuchspasten benützt wurde. Bei der Bewertung der Versuchsergebnisse durch Abmessen und Abwiegen wurde von der statistischen Methodik vorläufig abgesehen, da die beobachteten Abweichungen bereits auf eine unterordnete Rolle der geprüften Faktoren schliessen liessen.

Ergebnisse und Diskussion

Wurden die beiden Keimblätter der dekapitierten Erbsenkeimlinge gleichmässig zugeschnitten und die Schnittwunde des einen davon mit 0·5% GS-Paste und die des anderen mit Wasserpaste bestrichen, so war das Wachstumsverhältnis der beiden Kotylaren unregelmässig, offenbar durch andere schwer zu fassende Faktoren eingeleitet, ähnlich wie im Falle des Unberührtbleibens beider Keimblätter. Dass GS in die wachstumregulierende Wirkung der Keimblätter im Gegensatz zu IES nicht eingreift, geht auch aus Versuchen hervor, in denen die GS-Paste auf einen der beiden Keimblattstiele in der Nähe der Kotylarknospen oder auf sie selbst aufgetragen wurde, gleichgültig, ob die Knospen gleich nach der Dekapitierung des Epikotyls ganz klein oder einige Tage nach derselben vergrössert waren. Wider Erwarten gewann auch hier die mit GS angereicherte Knospe nicht die Oberhand über die anderen, ähnlich mit W-Paste behandelten. Dennoch handelte es sich um sehr wirksame GS-Pasten, da sie das Epikotylwachstum der Plumula der gequollenen ihrer Samenhaut beraubten Samen unter den gleichen Kulturbedingungen stark förderten, so dass es mehr als dreimal so schnell vor sich ging als bei den mit W-Paste ähnlich behandelten Pflanzen.

Dementsprechend liess sich das durch bloss ein belassenes Keimblatt zwischen den beiden Kotylarknospen induzierte Wachstumsübergewicht der Knospe in der Achsel des entfernten Keimblattes durch GS nicht verändern, etwa durch Behandlung der Achselknospe des belassenen Keimblattes mit GS-, und der des amputierten mit W-Paste. Die Achselknospe des entfernten Keimblattes wuchs in allen Fällen stärker heran und stellte wie üblich das Wachstum der mit GS-Paste behandelten sehr bald ein. Ebensowenig gelang es die apikale Dominanz durch GS-Pastenanstrich der sonst gehemmten unteren Seitenknospen zu stören, gleichgültig ob die Terminalknospe, oder nach deren Abschneiden die stark heranwachsende oberste Seitenknospe belassen wurde. Dasselbe gilt auch von anderen, ähnlich geprüften Objekten, beispielsweise von Laubsprossen von *Scrophularia nodosa* oder Jahrestrieben von *Syringa vulgaris*. In dieser Hinsicht ist jedoch ein Versuch von Interesse, bei dem der Epikotylstumpf der Erbsenkeimlinge median gespalten wurde und die oberste Schnittfläche der einen Hälfte mit GS-Paste, der anderen mit

W-Paste behandelt wurde oder unbehandelt blieb. Dadurch trat eine regelmässige Hemmung der Keimblattknospe unter der GS-Paste ein, so dass die gegenüberliegende Kontrollknospe die Oberhand gewann (Abb. 1b). Obwohl es sich um ausgewachsene Stümpfe handelte, kombinierte sich GS mit dem nativen Wuchsstoff und so war die Hemmung dieser Epikotylhälfte stärker, etwa so, wie es bei einem längeren Epikotylstumpf gegenüber dem opponierten, kürzeren gewesen wäre. Dies entspräche der oft festgestellten Wechselwirkung von GS, IES und anderen Stimulatoren (Kato 1958, Kuse 1958).

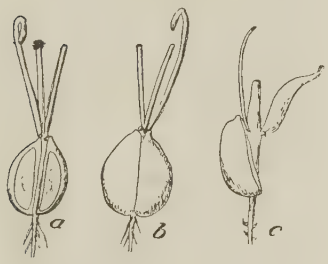


Abb. 1. *Pisum sativum.* a — Die linke Epikotylstumpfhälfte auf der oberen Schnittfläche und das rechte Keimblatt auf dem vorderen Schnitt mit 0·1% IES-Paste bestrichen, in der Dominanz des Kotylars links die primäre Regulationsrolle der Keimblätter zeigend. b — Die Epikotylstumpfhälfte links mit 0·5% GS-Paste, rechts mit W-Paste behandelt, eine Hemmungswirkung von GS in Wechselwirkung mit nativem Wuchsstoff zeigend. c — Die mit GS-Paste bestrichene Achselknospe des belassenen Keimblattes links treibt trotz der üblichen Dominanz des Achseltriebes des amputierten rechten Keimblattes aus, der durch Äthylenspuren gehemmt wurde.

Mit dieser Wechselwirkung zwischen GS und den nativen Wuchs- und Hemmstoffen hängt wahrscheinlich die durch GS gesteigerte Frequenz der Exemplare mit dreizähliger Blattform bei der Erbsensorte Olmützer Früheste zusammen. Bei dieser zeigen sich unter gewissen Kulturbedingungen derartige atavistische Blattbildungen meist am fünften Epikotylknoten und die Anzahl solcher Individuen wurde durch Samenvorbehandlung mit GS-Lösung 10 mg/L deutlich erhöht. (z. B. auf 66% statt 56 bei den Kontrollen). Sorten jedoch, die ohne Samenvorbehandlung mit schwachen Lösungen von Maleinhydrazid, beispielsweise einer 0·02 prozentigen, keine dreizähligen Blätter bilden, können auch durch GS nicht dazu veranlasst werden.

Ferner zeigte GS eine deutliche Wirksamkeit auf die Korrelationen bei künstlicher Hemmung des Wachstums der Erbsenkeimlinge. Im Einklang mit den Versuchen von Brian und Hemming (1957) konnten die nach Samenquellung in 0·1% MH-Lösung zunächst normal heranwachsenden Keimpflanzen, die jedoch später alles Wachstum einstellten, nicht mit GS stimuliert werden. Besonders die kleinen Kotylarknospen solcher Pflanzen blieben auch nach Behandlung mit GS-Pasten oder-Lösungen selbst an dekapitierten Pflanzen ganz klein, da sie schon von Anfang an die zum Wachstum nötigen Auxine nicht zu aktivieren vermöchten. Auch dies weist auf die Wechselwirkung von GS und nativem IES hin. So keimten auch die in stärkeren IES-Lösungen gequollenen Samen viel schneller, wenn ihre Plumula nach Abziehen der Samenhaut mit GS-Paste bestrichen wurde. Auch die Seitenwurzeln erschienen früher als an den langsamer wachsenden, nur mit IES vorbehandelten Vergleichspflanzen, an denen die untersten der basalen Seitenwurzeln erst später erscheinen und plattenförmig verwachsen. Für sich allein wirkt GS im Gegensatz zu IES auf die Entwicklung der Seitenwurzeln ungünstig. An dekapitierten Erbsenkeimlingen wuchsen bei Behandlung des

einen Keimblattes mit GS-Paste und des anderen mit W-Paste die Seitenwurzeln auf der Seite des Keimblattes ohne GS früher heran. Dekapitierte, eines Keimblattes beraubte Keimlinge, in einer Atmosphäre mit Äthylenspuren gehalten, zeigten trotz starker Hemmung das übliche Wachstumsübergewicht der Knospe in der Achsel des entfernten Keimblattes, doch war wenigstens in einigen Fällen die Achselknospe des belassenen Keimblattes zu einem allerdings dünneren Trieb vergrössert, wenn sie mit GS-Paste bestrichen wurde (Abb. 1c).

Starke Hemmungen des Wachstums charakterisieren unter den Holzgewächsen das vortreffliche Versuchsobjekt, den Flieder *(Syringa vulgaris)*. Die Dominanz der apikalsten Winterknospen an den Jahrestrieben wird durch die Stimulationswirkung des Wurzelsystems unter Mitwirkung der wachstumshemmenden Laubblätter verursacht. Die GS-Versuche wurden zunächst im Winter gegen Ende der "freiwilligen" Ruhe an grossen in Wasser getauchten Zweigen bei gewöhnlicher Laboratoriumstemperatur durchgeführt. Wurde eine der beiden obersten Winterknospen an den vorjährigen Jahrestrieben mit GS- und die andere mit W-Paste bestrichen, als sie sich zu öffnen anfingen, so entwickelte sich die mit GS behandelte Knospe zu einem erheblich kräftigeren Jahrestrieb mit längeren Internodien und Blattstielen sowie grösseren Blattspreiten im Vergleich zum gegenständigen Trieb aus der mit W-Paste behandelten Knospe. Aus dem Vergleich solcher ungleichseitigen Versuchsdichasien mit ähnlichen, aber nicht behandelten geht hervor, dass der W-Pastentrieb von dem GS-Pastentrieb im Wachstum korrelativ gehemmt wurde. Dabei wurde jedoch die Anzahl der Internodien und Blätter durch GS nicht gesteigert. Die obersten Blatt- und Internodienanlagen blieben nämlich an beiden Trieben der Versuchsdichasien im Wachstum zurück und liessen sich selbst durch Erneuerung der GS-Pastenanstriche zu weiterem Wachstum nicht bewegen. Dies gelingt jedoch sehr leicht durch eine frühzeitige Entfernung der Laubblätter, deren Hemmungswirkung auf die obersten Anlagen durch GS nicht aufgehoben werden kann. Darin besteht eine getreue Analogie zu den oben erwähnten Erbsenversuchen, in denen die Dominanz der Terminalknospe wie hier die Dominanzwirkungder Blätter durch lokale Behandlung mit GS ebenfalls nicht verändert wurde. Zu bemerken ist, dass die zurückgehaltene Terminalknospe sowie die Spitzenteile der obersten, gut entwickelten Blätter an den GS-Jahrestrieben früher absterben, als die entsprechenden Organe der opponierten Kontrolltriebe.

Auch diese eigentümliche Wirkung der Laubblätter auf die Terminalknospen, die dem für den Übergang der monopodialen zur sympodialen Verzweigung der Achsen verantwortlichen Mechanismus entspricht, lässt sich durch IES nachahmen und zwar an Jahrestrieben, die bei dieser Art allerdings nur sehr selten echte Terminalknospen beibehalten. Wurden an derartigen im Winter isolierten Jahrestrieben alle Seitenknospen abgeschnitten und auf die Schnittflächen stärkere IES-Pasten (0·5—1 %) aufgetragen, so öffnete sich die belassene Terminalknospe nicht, sondern starb ab, während der Jahrestrieb sonst gesund aussah. Pasten mit Zusatz von TIBA bzw. MH oder GS, die ähnlicherweise auf die Wundflächen nach dem Abschneiden der Seitenknospen angebracht wurden, verhinderten das Heranwachsen der allein belassenen Terminalknospen der isolierten Vergleichsobjekte nicht.

Mit der Unmöglichkeit, die oberen regelmässig eingehenden Organanlagen der sich sympodial verzweigenden Pflanzen durch GS wenigstens am Leben zu erhalten, stimmt auch die Tatsache überein, dass GS keinen bemerkbaren Einfluss auf die Korrelationen der Embryonalentwicklung der Winterknospen zeigte. Diese liess sich nicht verändern und auch die ersten Blattanlagen konnten nicht in Laubblätter umgestaltet werden, was durch Ende Herbst oder Anfang Winter vorgenommene Defoliation ganz junger getriebener Winterknospen leicht gelingt. Fertige Blütenstandanlagen bei *Syringa* entfalteten sich aus den mit GS-Paste behandelten Winterknospen zwar kräftiger als aus den nicht behandelten Kontrollknospen, doch waren die Infloreszenzen viel lockerer und zur Bildung neuer Blüten oberhalb der schon im Vorjahr angelegten kam es nie. Ebenso erfolglos war das Bemühen, durch GS die embryonale Ausbildung der künftigen Sprosse an den Knöllchen von *Ficaria verna* zu verändern. Erst vollständig angelegte Knospen liessen sich mit GS merklich stimulieren, sodass sich die Sprosse schneller streckten und auch die Wurzel- und Knöllchenbildung dadurch indirekt beschleunigt wurde. Ebensowenig liessen sich die inneren Hemmungen, die von den Laubblättern wenigstens an den der Wurzelentwicklung weniger günstigen Standorten ausgehen und die Sterilität dieser Pflanzen verursachen, durch GS abschwächen. Nur ganz unbedeutend wurde die Anzahl der Individuen mit fertilen Achänien durch Behandlung der Blütenstiele gesteigert. Desgleichen liessen sich die atavistisch zu deutenden Umbildungen: wurzelartig durchwachsende Knöllchen statt abgerundeter, oder lanzettlich gestaltete Blätter statt nierenförmiger, durch GS nicht hervorrufen.

Zu morphogenetischen Versuchen sind Knollengewächse wie *Solanum tuberosum*, *Scrophularia nodosa* und *Circaea intermedia* mit ihren Knollenbildungen von Achsennatur geeigneter, die sich auch als bequeme Bioteste auf GS verwenden lassen. Vor allem gilt dies von dicken Kartoffelkeimen, die an alten, in schwachem Lichte ohne Wasserzufuhr gehaltenen Mutterknollen gebildet werden und von SPERLICH (1930) zu Versuchen über die von ihm studierte Wasserdynamik verwendet wurden. Von den Mutterknollen isoliert und im feuchten Raum auf Sand gehalten, trieben sie nach Behandlung mit GS-Lösungen oder Pasten aus allen Seitenknospen dünne, aufwärtsgerichtete Triebe, da die Dominanz der ebenfalls stark durchwachsenden Gipfelknospe durch GS abgeschwächt wurde. Es genügt dazu die Gipfelknospe solcher Keime mit Paste zu bestreichen, um die Wurzelentwicklung in der Nähe der Seitentriebe zu verhindern, die an den Kontrollkeimen ohne Knospenentwicklung zustande kommt. Wird GS-Paste auf die Keimanfänge der im Winter trocken gehaltenen Mutterknollen angebracht, so entstehen aus ihnen, statt dicker rötlich-violetter Keime mit ganz kurzen, aufwärts gebogenen Seitenknospen und mit gut erhaltener Gipfelknospe der Kontrollkeime mit W-Paste, nur dünne grün gefärbte Keime, die sich verästeln, da ihre Streckungszonen nach einiger Zeit der Nekrobiose unterliegen (Abb. 2). Auch diese Seitentriebe sterben an der Spitze ab und verästeln sich weiter. Daraus folgt, dass die mit GS-Paste vorbehandelten Keime trotz ihrer Stimulation die Reservestoffe in hinreichender Menge der Mutterknolle nicht zu entnehmen vermögen, im Gegensatz zu den sich verdickenden Kontrollkeimen, und deswegen bleiben sie auch dünn und anthocyanfrei. Auf Kosten derselben Re-

Abb. 2. *Solanum tuberosum.* a — Eine ohne Wasserzufuhr vorgekeimte Kartoffelknolle mit dicken, rötlich violetten Keimen aus Augen, die mit W-Paste bestrichen wurden, und mit dünnen verästelten grün gefärbten Keimen aus Augen (x), die mit W-Paste bestrichen wurden. b — Die mit (xx) bezeichneten Keime nachher an der Spitze mit GS-Paste bestrichen, aus allen Knospen austreibend.

Abb. 3. *Circaea intermedia.* a — Ein an der Spitze mit W-Paste bestrichenes Knöllchen knollenartig weiter durchwachsend. b — Ein ähnliches mit GS-Paste behandeltes Knöllchen, orthotrope, dünne Triebe ausbildend. *Scrophularia nodosa.* c — Eine dekapitierte, auf der rechten Seite aller Wurzeln beraubte Knolle, Seitenknospen rechts mit W-Paste, links mit GS-Paste bestrichen. Das korrelative Übergewicht gewinnt eine durch Wurzeln stark stimulierte Knospe.

servestoffe kommt es hier zu einer abweichenden Gestaltung, die anscheinend der systemischen Wirkung von GS widerspricht (vgl. LIPPERT, RAPPAPORT, TIMM 1958). Dass ganze mit GS behandelte Kartoffelknollen früher austreiben, ist auch bekannt (RAPPAPORT, LIPPERT u. TIMM 1957). Besonders rasch trieben die im Sommer und Herbst aus alten Knollen herangewachsenen Tochterknollen fadenförmige, an die Filosität erinnernde Keime aus mehreren Augen, während die mit Wasser vorbehandelten Knollen noch längere Zeit ruhten.

Ähnliches zeigen Knöllchen von *Circaea intermedia*, wenn sie ohne hinreichende vorherige Kälteeinwirkung im Spätherbst oder im Winter bei Zimmertemperatur im feuchten Sand gehalten werden. Ohne GS-Behandlung wuch-

sen sie sehr langsam unter Bildung kurzer dicker Internodien und kleiner Niederblätter in waagrechter Richtung durch (Abb. 3a). Mit einem kleinen GS-Pastetropfen an der Spitze derartiger knolliger Zuwächse bildeten sie jedoch mehrere haarförmige orthotrope Triebe mit schmalen Laubblättern aus (Abb. 3b). Ähnliche, auch noch zum Teil ruhende Knöllchen in die Erde bis auf den Gipfelteil eingesetzt, trieben nach derselben GS-Behandlung lange, schräg aufwärts gerichtete Ausläufer, während die Kontrollknollen nur an der Spitze knollenartig weiterwuchsen und erst später auch einen terminalen Ausläufer bildeten, der sich jedoch in die Erde einbohrte, wo er knollenartig anschwoll. An den GS-Ausläufern kam es nie zur Knollenbildung, im Gegenteil starben sie an der Spitze ab. Auch diese Nekrobiose deckt sich mit der der Kartoffelkeime an unter ungünstigen Aussenbedingungen vorgekeimten Knollen. Sie hängt mit einem Ca-Ionenmangel zusammen, der sich nach Erreichen einer gewissen Länge der Keime in ihrer Streckungszone einstellt, und durch lokale Zufuhr von Ca-Salzen zurückgehalten wird, während exogene IES die Nekrobiose beschleunigt (Dostál 1943).

Nach den bisher erwähnten Versuchen setzte GS die aus den noch ruhenden Reservestofforganen hervorgehenden Wachstumshemmungen herab, jedoch nicht im gleichen Masse wie die Wurzeln und ohne nachträgliche Ernährungsstörungen. Wurden Knollen von *Scrophularia nodosa* der Terminalknospe und aller Wurzeln auf einer Seite gegen Ende des Winters beraubt, trieben sie nur auf der Seite mit belassenen Wurzeln aus, also nicht auf der Seite ohne Wurzeln, selbst wenn die Knospen hier mit GS-Paste bestrichen wurden (Abb. 3c). Man könnte annehmen, dass wenigstens bei diesen Objekten die Wurzeln zur Bildung nativer GS-artiger Stoffe in den Knospenanlagen beitragen, die dann die Zufuhr von exogener GS überflüssig machen. Sonst kann die Wurzelwirkung in dieser Hinsicht zum Teil durch GS ersetzt werden, und damit mag auch zusammenhängen, dass dieser Stoff die Entwicklung der Wurzeln oft einschränkt (Krekule und Ullmann 1959). Die erst im Spätsommer isolierten Blattpaare von *Scrophularia nodosa* trieben aus ganz kleinen Achselknospen nur sehr träge aus und oft nur dann, wenn gleichzeitig am unteren Sprossabschnitt Wurzeln gebildet wurden, was der Korrelation zwischen dem Knospenwachstum und der Wurzelneubildung entspricht. GS stört jedoch diese Korrelation, so dass an den Blattpaaren, deren Achselanlagen mit GS-Paste bestrichen wurden, die gleiche Triebentwicklung, jedoch ohne Wurzelbildung stattfand (Abb. 4).

Die spezifische Rolle der Wurzeln in den Wachstumskorrelationen geht auch aus Versuchen mit Leinkeimlingen *(Linum usitatissimum)* hervor, an denen jedoch im Gegensatz zu den Erbsenkeimpflanzen nach Dekapitierung und Amputation eines Keimblattes die Achselknospe des belassenen Keimblattes die Dominanz gewinnt (Abb. 5a). Wird jedoch auch die Wurzel entfernt, verhalten sie sich ähnlich wie die Erbse, da die Achselknospen von dem belassenen Keimblatt regelmässig korrelativ gehemmt werden (Abb. 5b). IES- sowie GS-Paste auf das belassene Keimblatt aufgetragen, ändern diese beim Lein so auffallend hervortretenden Dominanzunterschiede der Kotylarknospen nicht. Wird jedoch ein Keimblatt mit schwarzem Seidenpapier umwickelt und nur das andere dem Licht ausgesetzt, treibt die Achselknospe des verdunkelten Keimblattes bei *Linum* nicht erkennbar und

Abb. 4. *Scrophularia nodosa.* Isolierte, aufeinander folgende Blattpaare, Knospen an dem mittleren mit W-Paste und an den zwei anderen mit GS-Paste behandelt. Bei gleicher Triebentwicklung blieb an den mit GS behandelten Sprosstücken die Wurzelbildung aus.

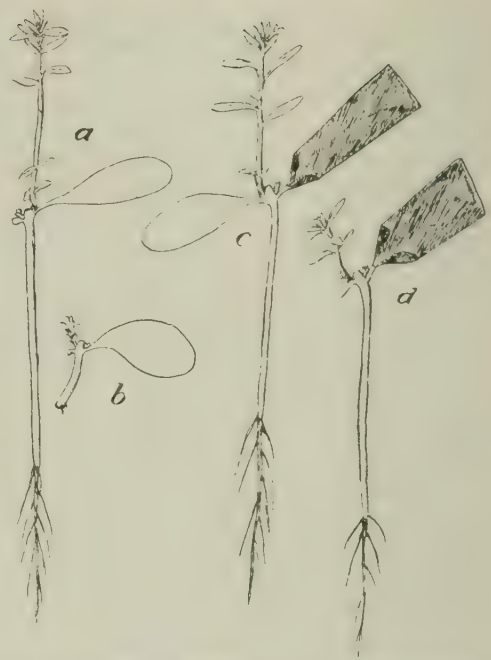


Abb. 5. *Linum usitatissimum.* a — Die belassene Wurzel erteilt dem Keimblatt eine stimulierende Wirkung auf seine Achselknospe. b — ohne Wurzel wirkt das Keimblatt auf seine Achselknospe hemmend ein. c — Das verdunkelte Keimblatt hemmt das Wachstum seiner Achselknospe. d — Dies erfolgt auch, wenn das andere Keimblatt entfernt wurde, trotz der belassenen Wurzel.

zwar auch dann nicht aus, wenn es mit IES-oder GS-Paste bestrichen worden ist (Abb. 5c). Das verdunkelte Keimblatt wirkt auf seine eigene Achselknospe auch dann hemmend ein, wenn das andere Keimblatt entfernt wurde, gleichgültig ob die Wurzel belassen oder entfernt wird (Abb. 5d). Dabei bleiben die verdunkelten Keimblätter lange Zeit hindurch erhalten und grün gefärbt. Auffallend ist die konvexe Biegung des Hypokotyls dicht unter dem verdunkelten Keimblatt, dessen Produkte die Lichthemmungen auf dieser Seite herabsetzen. Auf das Kotylarwachstum wirken diese jedoch ebenso hemmend wie TIBA oder MCPA (Methylchlorphenoxyessigsäure) und die Wurzel vermag alle diese Hemmungen nicht zu beseitigen.

Wie die Wurzelentwicklung, so erscheint auch die Knollenbildung durch GS korrelativ gestört. Die der Basis erwachsener Sprosse von *Circaea intermedia* entnommenen Blattpaare treiben bei isolierter Kultur im feuchten Sand abwärts geneigte Ausläufer, die im Sand später knollenförmig anschwellen. Werden solche Blattpaare median halbiert und die Achselknospe an der einen Hälfte mit GS- und die an der anderen mit W-Paste bestrichen, entwickeln sich aus der mit GS behandelten Knospe mehrere orthotrope Triebe mit langen dünnen Zweigen und schmalen Laubblättern, während aus den Kontrollknospen mit W-Paste auf Kosten derselben Stützblattprodukte

typische Ausläufer mit Knöllchen an der Spitze entstehen (Abb. 6a). Die Knollenbildung wird durch GS bereits aus dem Grunde nicht gefördert, weil dieser Stoff die Knospenanlagen zu starkem Streckungswachstum aktiviert. Man braucht nur das Verhalten isolierter Blattpaare von *Scrophularia nodosa* zu vergleichen, wie aus Abb. 6 ersichtlich ist. Die Knospe mit GS-Paste streckte sich zu einem langen, dünnen aufrechten Trieb (Abb. 6d), während die dekapitierte Knospe sich zu einem dicken Knöllchen gestaltete (Abb. 6c); die intakte Kontrollknospe hat sich unter der Hemmungswirkung des Stützblattes und des eigenen Terminalmeristems nicht merklich verändert (Abb. 6b).

Das Gegenteil beobachtet man oft bei der Blütenbildung, die durch GS gefördert werden kann, wenn sie z. B. an den Langtagpflanzen im Kurztag oder an den zweijährigen Pflanzen ohne vorherige Kältebeeinflussung eine gewisse Internodienstreckung erfordert. Dennoch kann sich in manchen Fällen eine übermässige Streckung der Achse in der Produktionsabnahme ungünstig auswirken. Modellartig zeigen es zum Beispiel isolierte Blätter von *Bryophyllum crenatum*, an denen die Produktion der Marginalknospen durch ein längeres Achsenstück oder sogar nur den Blattstiel deutlich herabgesetzt wird. Doch konnte die Produktion der Marginaltriebe durch GS-Paste nicht gesteigert werden, wie dies durch Teilung der Blattspreiten leicht gelingt, wodurch gewisse Hemmungen beseitigt werden. Mit diesen hängt wahrscheinlich auch die Langkurztagnatur dieser Pflanzenarten zusammen (Dostál 1949, Resende 1952), die sich mit GS nur soweit beeinflussen lässt, als sie die Hemmungen der Achsenstreckung im Kurztag herabsetzt. Gleichzeitig müssen jedoch die mit GS-Paste oder- Lösung behandelten Pflanzen auch weiterhin im Kurztag gehalten werden, um sie zur Blütenbildung zu induzieren (Bünsov und Harder 1956). Werden sie hingegen gleich nach GS-Behandlung dem Langtag ausgesetzt, so strecken sie sich zwar stärker, als im Kurztag, doch bleiben sie vegetativ (Dostál 1959). Ohne Photoperiodisierung kann man sich von dieser GS-Wirkung überzeugen, wenn man die Blattrosetten, die im Winter entweder in der Achsel der oberen Blätter an abgeblühten Pflanzen, oder an der Spitze schwächerer, vegetativ gebliebener Sprossen entstehen, mit GS-Paste oder -Lösung behandelt. Geschieht dies zum Beispiel Anfang Februar, also noch zur Zeit natürlicher kurzer Photoperioden, wachsen diese Blattrosetten auf Kosten der vorjährigen Langtagteile zu langgliedrigen Trieben mit schmalen Blättern und Blüten aus (Abb. 7a); die unbehandelten Rosetten werden zu vegetativen Trieben, die erst im nachfolgenden Herbst zu Blütenanlagen gelangen (Abb. 7b). GS vermag also nur den Lang-, jedoch nicht den Kurztag zu ersetzen, da diese tropischen Pflanzen phylogenetisch an den Kurztag angepasst sind und der blütenfördernden Wirkung von GS ebenso wie die typischen Kurztagpflanzen (Lincoln und Hamner 1958) widerstehen. *Bryophyllum*-Pflanzen, die aus den kleinsten, im Winter gebildeten Axillarrosetten heranwachsen, bilden auch im Kurztag bei starker Lichtintensität lange Internodien, ebenso wie basale Seitentriebe alter, typischer Kurztagrosetten, ohne jedoch zu blühen. Im Gegensatz dazu liess sich unter mehreren tausend Kurztagpflanzen an zwei kräftigen Rosetten je eine Blüte beobachten. Im Einklang mit Tschailachjan (1958) wäre eine eingehende physiologisch-biochemische Analyse der Blütenbildung sehr erforderlich.

Abb. 6. *Circaea intermedia*. a — Ein isoliertes halbiertes Blattpaar. Die Knospe links, mit W-Paste bestrichen, bildet einen an der Spitze knollig anschwellenden Ausläufer, die Knospe rechts mit GS-Paste entwickelt sich zu dünnen orthotropen Trieben. *Scrophularia nodosa*. Einblättrige Sprosstücke: b — die unberührte Achselknospe bleibt unverändert, c — die dekapitierte Knospe wird zu einem Knöllchen, d — die mit GS-Paste bestrichene Knospe wächst zu einem langen aufrechten Laubtrieb heran.

Abb. 7. *Bryophyllum crenatum*. a — Die apikale Blattrosette, Anfang Februar mit GS-Paste behandelt, bildete im Frühjahr einen langen Spross mit schmalen Blättern und Blüten. b — Eine Kontrollrosette, mit W-Paste behandelt, wuchs vegetativ weiter (gezeichnet am 15. Mai).

Dies mag auch von den Wachstumskorrelationen gelten. Aus den hier angeführten Versuchen geht bereits hervor, dass GS zwar die Hemmungen beim Übergang der Pflanze aus der Ruhe in die Aktivität aufhebt, jedoch nicht diejenigen, die bei voller Aktivität zur Ruhe führen. Somit erscheinen die Aussichten, etwa die rhythmische Wachstumsunterbrechung der Holzgewächse durch GS zu beherrschen, sehr gering. Es liegt die Annahme nahe, dass die verschiedenen Korrelationen, die nach Darwin das Produkt der Phylogenese darstellen, ungleich tief in der lebenden Substanz verankert werden.

Literatur

Brian, P. W., Hemming, H. G.: The effect of malein hydrazide on the growth responses of plants to gibberellic acid. — Ann. appl. Biol. **45** : 489—497, 1957.

Bünsov, R., Harder, R.: Blütenbildung von Bryophyllum durch Gibberellin. — Naturwiss. **43** : 479, 1956.

Dostál, R.: Über die Nekrobiose der Kartoffeldunkelkeime. — Phytopath. Ztschr. **14** : 484—496, 1943.

Dostál, R.: O fotoperiodismu a korelacích u *Bryophyllum crenatum* [Über den Photoperiodismus und die Korrelationen bei *Bryophyllum crenatum*]. — Rozpr. Čes. Akad. (Praha) **59** : 1—34, 1949.

Dostál, R.: Versuche zur apikalen Dominanz in der Pflanzenmorphogenese. — Práce Brněnské zákl. ČSAV (Acta Acad. scient. čechoslovenicae Basis brunensis). **31** : 1—48, 1959.

Dostál, R.: Gibberellic acid and growth correlations. — Nature **183** : 1318, 1959.

Havránek, P.: Experimentální studie o vzrůstové regulaci v odpočívajících hlízách *Scrophularia nodosa* [Experimentalstudie der Wachstumsregulierung in Knollen von *Scrophularia nodosa* in der Ruhe]. — Diss., Vys. škola zvěrolék. Brno, 1925.

Kato, J.: Studies on the physiological effect of gibberellin II. On the interaction of gibberellin with auxin and growth inhibitors. — Physiol. Plant. **11** : 10, 1958.

Krekule, J., Ullman, J.: The influence of gibberellic acid on the growth of overground parts and roots of wheat, lettuce, and oats. — Biol. Plant. **1** : 22—30, 1959.

Kuse, K.: Necessity of auxin for the growth effect of gibberellin. — Bot. Mag. **71** : 151, 1958.

Lincoln, R. G., Hamner, K. C.: An effect of gibberellic acid on the flowering of *Xanthium* a short-day plant. — Plant. Physiol. **33** : 101—104, 1958.

Lippert, L. F., Rappaport, L., Timm, H.: Systemic induction of sprouting in white potatoes by foliar application of gibberellin. — Plant Physiol. **33** : 132—133, 1958.

Plch, B.: Über den Einfluss einiger Phytohormone auf die Korrelationswirkung des Keimblattes bei *Pisum sativum*. — Beih. bot. Zbl. A **55** : 358—415, 1936.

Rappaport, L., Lippert, C. F., Timm, H.: Breaking dormancy with gibberellic acid. — Amer. Potato J. **34** : 354, 1957.

Resende, F.: "Long-short" day plants. — Portug. Acta biol. ser. l. **3** : 318—322, 1952.

Sperlich, A.: Über die Wasserdynamik. — Jahrb. wiss. Bot. **72** : 161, 1930.

Thimann, K. W., Skoog, F.: Studies on the growth hormones of plants III. The inhibitory action of the growth substances on bud development. — Proc. Nat. Acad. Sci. **19** : 714—716, 1933.

Thimann, K. W., Skoog, F.: On the inhibition of bud development and other functions of growth substances in *Vicia Faba*. — Proc. Roy. Soc. B. **114** : 317—339, 1934.

Tschailachjan, M. Ch.: Hormonale Faktoren des Pflanzenblühens. — Biol. Zbl. **77** : 641—662, 1958.

Uhrová, A.: Über die hormonale Hemmungswirkung der Blätter bei *Bryophyllum crenatum*. — Planta **22** : 411, 1934.

Wanka, J.: O vlivu koleoptilí ovsa na korelace u rostlin [Über den Einfluss der Koleoptilen des Hafers auf die Korrelationen bei Pflanzen]. — Diss., Vys. škola zvěrolék., Brno 1929.

Adresse des Autors: Prof. Dr. Rudolf Dostál, Botanický ústav Vysoké školy zemědělské. Zemědělská 1, Brno, ČSR.

BIOL. PLANT. 2 (1) : 48—60, 1960

О действии гиббереллиновой кислоты и других стимуляторов на ростовые корреляции растений

РУДОЛЬФ ДОСТАЛ

Кафедра ботаники Сельскохозяйственного и лесного института в Брно

Резюме

В работе дается обзор результатов морфологических опытов, направленных, прежде всего, на решение вопроса о влиянии гиббереллиновой кислоты (ГК) на корреляции роста и развития растений. В связи с этим рассматривается возможность применения веществ этого типа для компенсирования факторов, ограничивающих рост и плодовитость растений, что особенно ярко проявляется в случае древесных пород. Опыты проводились на обычных модельных растениях: прорастающем горохе и льне, ростках картофеля, молодых ветках сирени, осевых частях дикорастущих растений с клубнями (норичник, двулепестник, чистяк) и на *Bryophyllum*. Эти растения соответственным образом подготовлялись для того чтобы по возможности упростить сложные ростовые взаимоотношения органов растения. ГК применялась большей частью в виде местного средства — 0,5% ланолиновой пасты.

Оказалось, что влияние ГК на корреляции роста заключается в том, что она ослабляет ингибиционное действие ассимилирующих листьев и вегетативных запасных органов и что в этом отношении она в определенной мере замещает стимуляционное действие корней, что, однако, не происходит без широко известных деформаций, проявляющихся в виде некрозов верхушек. При помощи ГК не удается воздействовать на отношения доминирования между определенными почками, также как и на основные регуляционные функции листьев и семядолей. В этом отношении действие ГК существенно отличается от действия β-индолилуксусной кислоты. ГК не нарушает также корреляций, определяющих эмбриональную закладку органов в зимних почках. На образование цветков у *Bryophyllum crenatum*, которое является растением и длинного и короткого дня, ГК влияет только в условиях короткого дня, что, повидимому, связано с филогенетическим приспособлением к тропическим условиям. Если розетки, выращивавшиеся в условиях короткого дня, перенести сразу же после обработки ГК в условия длинного дня, то они не зацветают, также как и растения длинного дня, получившие ГК или не получившие ее. В работе упоминается о взаимодействии ГК с β-индолилуксусной кислотой, трийодбензойной кислотой, малеингидразидом и другими стимуляторами: эти взаимодействия проявляются в изменениях корреляций роста.

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

2 (1) : 61—66, 1960

Interspecific Hybridization between *Corchorus olitorius* Linn. (Strain C. G.) and *C. sidoides* F. Muell., and *C. capsularis* Linn. (Strain D 154) and *C. sidoides* Muell.

R. M. Datta and S. K. Dana

Department of Agriculture, Calcutta University

Received June 19, 1959

Souhrn

Autoři sledovali možnost mezidruhového křížení mezi *Corchorus olitorius* Linn. a *C. sidoides* F. Muell a *C. capsularis* Linn s *C. sidoides* F. Muell.

1. U kombinace *C. olitorius* ♀ × *C. sidoides* ♂ se založilo 29,4 % plodů a sklizeno bylo jen 20 % plodů z celkového množství. Všechny sklizené plody byly sterilní.

2. U kombinace *C. sidoides* ♀ × *C. olitorius* ♂ se zakládalo 26,8 % plodů, z nichž dozrálo 9 %. Jeden sklizený plod obsahoval tato semena: 4 sterilní, 9 částečně plných a 4 zřetelně plná semena. Ani jedno z nich nebylo klíčivé.

3. Při křížení *C. capsularis* ♀ × *C. sidoides* ♂ a při reciprokém křížení se zakládalo 31 % a 20 % plodů, z nichž žádný plně nedozrál.

4. Fylogeneticky se tyto tři sledované druhy vzájemně značně liší.

Summary

1. In *C. olitorius* ♀ × *C. sidoides* ♂, the pod set was 29·4 per cent and the percentage of pod harvested (out of the set pods) was 20 per cent. All harvested pods were empty.

2. In *C. sidoides* ♀ × *C. olitorius* ♂, the pod set was 26·8 per cent and that 9·0 per of the cent pods were harvested. The single harvested pod yielded the following types of seeds — 4 empty seeds, 9 partially full seeds and 4 apparently full seeds. The apparently full seeds were underweighed. All seeds were non-viable.

3. The pod sets in *C. capsularis* ♀ × *C. sidoides* ♂ and in its reciprocal were 31 per cent and 20·0 per cent respectively. No pod remained till maturity.

4. These three species are phylogenetically wide apart.

Introduction

Corchorus olitorius Linn. and *C. capsularis* Linn. are the two cultivated jute species. Each species has a certain number of desirable characters of its own. Several workers have tried to combine these desirable characters (industrial as well as agricultural) by hybridization, but all of them have failed. Finlow (1917, 1921, 1923) first tried hybridization between these two species but failed to get any hybrid. Howard (1924) confirmed this. Patel, Ghose and Dasgupta (1944) after attempting seven different methods to hybridize these two species reported that "often pods were obtained but the seeds were not viable and well developed, being light in weight and pale coloured". Ultimately they also failed to get any hybrid and concluded that these two species have different centres of origin and phylogenetically they are wide apart. Datta (unpublished, a) carried on interspecific hybridization between different types (both wild and cultivated) of these two species *(C. olitorius* and *C. capsularis)* and between different wild species of *Corchorus* on an extensive and intensive scale for three consecutive years (1953—1955) to find out whether there is any seasonal difference. He observed pod setting in practically all the crosses but the percentages of pod setting varied in different crosses including the reciprocal ones. Few seeds were obtained and they were of three types—empty, partially full, and apparently normal-looking full seeds. The percentages of these three types of seeds varied in different crosses, even in reciprocals. A few apparently normal-looking full seeds were underweighed, when compared with the same number of selfed seeds from their respective female parents. This suggested the underdevelopment of the seed tissues of embryo and/or endosperm. All the seeds did not germinate in next seasons.

As all the species of *Corchorus* (cf. Table 2 of Datta, unpublished, a) were found to be cross-incompatible, the wild species from Australia (viz. *C. sidoides* F. Muell.) was crossed with *C. capsularis* and *C. olitorius* with a view of getting any viable hybrid which can be used for bridge crossing to overcome the strong incompatibility barrier existing amongst the two cultivated jute species.

Material and Methods

Seeds of *Corchorus sidoides*, a wild species of jute, were obtained by Sri R. M. Datta in 1957, prior to the jute season from Dr. W. Hartley, Principal Plant Introduction Officer, Commonwealth Scientific Research Organisation (Division of Plant Industry), Canberra, Australia. The seeds were sown in pots. The plants flowered from May to October. The flowers generally open at 9 to 9.30 A. M. and close at 1 to 1.30 P. M. The haploid chromosome number of this species has been reported to be seven (Basak 1958), thus the same as in the cultivated species.

Table 1. Summary of the reciprocal crosses between *C. olitorius* (Strain C. G.), *C. capsularis* (Strain D 154), and *C. sidoides* F. Muell.

Sl. No.	Cross		No. of flowers pollinated	No. of pods set	% of pods set	No. of pods harvested	% of pods harvested	Seeds				Seeded or empty	Percentage of seeds			
	Parent ♀	Parent ♂						empty	par-tially full	full			empty	par-tially full	full	
1.	*C. olitorius* (C. G.)	*C. sidoides*	34	10	29·4	2	20·0	0	0	0		empty	0	0	0	
2.	*C. sidoides* *(2 mg.)	*C. olitorius* (C. G.)	41	11	26·8	1	9·0	4	9	4 (1·25 mg.)		Seeded	23·5	53·0	23·5	
3.	*C. capsularis* (D 154)	*C. sidoides*	29	9	31·0	0	0·0	0	0	0			0	0	0	
4.	*C. sidoides*	*C. capsularis* (D 154)	25	5	20·0	0	0·0	0	0	0			0	0	0	

* Figures in brackets indicate the seed weights in milligrams.

Flowers of *C. capsularis* open at about 9 A. M. and remain open for about 6 hours. Flowers of *C. olitorius* open at 7 A. M. or a little earlier and remain so for about 7 hours.

Flowers were carefully emasculated in the previous afternoon with finely pointed loose sterilised forceps and bagged with cellophane paper bags. Much care and vigilance are needed while emasculating smaller flowers of *C. sidoides* and *C. capsularis*. The next morning the bags were removed and after carefully pollinating the emasculated flowers with pollen from the desired parents, they were immediately bagged and labelled.

One week after pollination the bags were removed and records were taken as to whether the flowers had set pods or fallen into the bag. Every set pod was labelled. Each week the set pods were checked individually whether they were continuing to grow or had fallen off. In these crosses the number of flowers pollinated, pods set and harvested were recorded. The cross pods were harvested after they matured fully. The seeds were extracted pod-wise; they were then classified as to full, partially full and empty (shrivelled) seeds and their percentages were calculated. The full seeds when obtained were weighed and compared with the weight of the same number of seeds of their female parents, taken at random from the bulk of selfed seeds.

Results

After crossing *C. olitorius* with *C. sidoides* it was observed that pod set was only 29·4 per cent and only 20 per cent of the set pods remained till maturity and were harvested. In case of *C. sidoides* × *C. olitorius* pod set was 26·8 per cent and 9·0 per cent of these pods were harvested. In the former case, 2 pods matured in 25 days after crossing. They were very small in size and had no seed of any kind. In the latter cross one pod matured in 41 days and contained all the three kinds of seeds.

In case of *C. capsularis* ♀ × *C. sidoides* ♂ and *C. sidoides* ♀ × *C. capsularis* ♂ the pod set were 31 per cent and 20·0 per cent respectively, but no pod was finally harvested (cf. Table 1).

It is evident from Table 1 that the majority of the set pods failed to reach maturity and shed during different stages of growth. Only in one case a seeded pod was obtained.

The quality and quantity of seeds produced in that single pod varied greatly. Full seeds from the cross pod were found to be less in weight than the corresponding number of randomly selected selfed seeds of the maternal parent. All the seeds were separately sown in pots this year (April, 1958), but they did not germinate.

The average number of ovules per pod and number of seeds per gramme of these species (when selfed) are given below for comparison.

Species	Average number of ovules in a pod	Number of seeds per gramme
C. capsularis	50	300
C. olitorius	200	500
C. sidoides	55	1893

Discussion

It has been observed by Datta (unpublished, a) and Banerji and Datta (in press) that in cross pollinated ovaries of both the species *(C. olitorius* and *C. capsularis)*, the rate of pollen tube growth down the styles is slower than that in case of self-pollination. In both the cases of cross-pollinations, only the few uppermost ovules are found to be fertilized, while the lower ones are seen to be collapsed. Datta (unpublished, a) first records that fertilization is in process in *capsularis* ♀ × *olitorius* ♂, at 2 days, and in *olitorius* ♀ × *capsularis* ♂ at 3—4 days after pollination. In normal self-pollinations of both the species, fertilization is first noticed in embryo-sacs 6 hours after pollination and triple fusion after 10 hours (Banerji, 1932). In the crosses between *olitorius* and *capsularis* Banerji and Datta (in press) have observed that the fertilized egg maintains two distinct nucleoli of different sizes till 20 days and the zygote does not divide till this time. Even the gametic fusion is sometimes withheld and unburst pollen tubes can be seen in the micropyles of the crossed ovules till this period. Finally the production of underweighed, non-viable full seeds, partially full and empty seeds clearly point out that there are some sorts of difficulties in normal growth of embryo and/or endosperm. Apparently there is some disharmony between endosperm and embryo or any one or both of them with the maternal tissues, which ultimately leads to the production of non-viable seeds.

The main barriers to success in this interspecific hybridization are: (1) the inability of most of the pollen tubes to grow rapidly and fertilize a majority of the ovules, (2) the long delay in actual fertilization processes, and (3) the failure of the zygote to divi de early to form an embryo, if any, and (4) the failure of a few seeds thus produced to germinate. The last one is termed as "hybrid inviability" by STEBBINS (1950) and this strongest barrier is considered to be one of the most widespread factors in isolation of plant species.

From these results it thus appears that these species of the genus *Corchorus*, though having the same chromosome numbers, are phylogenetically so wide apart that successful hybridization is well nigh impossible. Hybrid embryo-culture or crossed ovary culture with or without hormones should be tried to overcome this insurmountable genic incompatibility.

References

BANERJI, I.: The development of the embryo-sac and fertilization in jute. — J. Ind. bot. Soc. **11** : 228—240, 1932.

BANERJI, S. P. and DATTA, R. M. (in press): Studies on the cytogenetical basis of incompatibility in the two cultivated jute species (*Corchorus olitorius* LINN and *C. capsularis* LINN).

BASAK, S. L.: Variations in the haploid chromosome number of *Corchorus sidoides* F. MUELL. (Family: *Tiliaceae*). — Current Sci. **27** : 101, 1958.

DATTA, R. M. (Unpublished, a): Interspecific hybridization between *Corchorus olitorius* LINN. and *C. capsularis* LINN. and the cytogenetical basis of incompatibility between them. (Chapter I of the D. Sc. thesis submitted to the Calcutta University).

FINLOW, R. S.: Improvement of jute crop by pure line selection. — Agric. J. India **12** : 3—29, 1917.

FINLOW, R. S.: Historical notes on experiments with jute in Bengal. — Agric. J. India **16** : 265—279, 1921.

FINLOW, R. S.: Note on the work on fibre relation. — Bengal Agr. J. **3** : 138, 1923.

HOWARD, A.: Crop production in India. — Oxford Univ. Press, p. 138, 1924.

PATEL, J. S., GHOSE, R. L. M. and DASGUPTA, B.: The genetics of *(Corchorus)* jute. Part II. Inheritance of anthocyanin pigmentation. Agr. Res. Mem. No. 3. Ind. Cent. Jute Com.: 1—42, 1944.

STEBBINS, G. L. jr.: Variation and evolution in plants. Columbia Univ. Pres, N. Y., 1950.

Address: R. M. Datta and S. K. Dana, Department of Agriculture, Calcutta University, India.

BIOL. PLANT. 2 (1) : 61—66, 1960

Межвидовое скрещивание растений *Corchorchus olitorius* L. (линия *C. G.*) с *C. sidoides* F. Muell. и *C. capsularis* L. (линия D 154) с *C. sidoides* F. Muell

Р. М. ДАТТА и С. К. ДАНА
Отдел сельского хозяйства Калькаттского университета

Резюме

1. При скрещивании *C. olitorius* ♀ × *C. sidoides* ♂ завязывалось 29,4% плодов и собрано было лишь 20% плодов от количества завязанных. Все собранные плоды оказались пустыми.
2. При скрещивании *C. sidoides* ♀ × *C. olitorius* ♂ завязывалось 26,8% плодов и 9,0% от количества последних созрело. Один собранный плод содержал следующие типы семян: 4 пустых семени, 9 частично полных и 4 явно полные семена. Вес последних был ниже нормы. Ни одно из полученных семян не было жизнеспособным.
3. При скрещивании *C. capsularis* ♀ × *C. sidoides* ♂ и при реципрокном скрещивании завязывалось соответственно 31 и 20 процентов плодов. Ни один из них не достиг полной зрелости.
4. В филогенетическом отношении три исследованных вида стоят далеко друг от друга.

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

2 (1) : 67—69, 1959

The Application of Neutron Activation Chromatography to the Determination of the Purity of Phosphate Preparations

Jiří Luštinec

Department of Plant Physiology, Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha

Received May 12, 1959

Souhrn

Tepelnými neutrony v jaderném reaktoru o toku $10^{12} . n . cm^{-2} . sec^{-1}$ byly během devítihodinové exposice aktivovány sloučeniny fosforu na papírovém chramatogramu.

Tímto způsobem lze snadno detegovat 0,1 μg P/cm^2, čehož bylo využito při zjišťování čistoty preparátů fosforečných esterů. Metoda má význam zvláště pro analysu malých množství dražších fosfátů.

Growing use is being made at the present time of the opportunities afforded by the application of neutron activation analysis in chemistry and biology. The method has been employed with success for the identification of basic metals in nerve fibres (Keynes and Lewis 1950), of arsenic in hair (Griffon et Barbaud 1951) and in various other biological materials (Smales and Pate 1952), of cobalt and strontium in animal tissues (Brooksbank et al. 1953) and of cobalt and vanadium in plants (Benson 1958).

Winteringham et al. (1952) used neutron activation for the detection and quantitative determination of bromine and chlorine compounds on paper chromatograms, while Schmeiser and Jerchel (1953) used it for sulphur, chlorine, bromine and phosphorus compounds on paper chromatograms and electrophoretograms. Benson and Maruo (1957) applied the same method for the identification of diglycerophosphate in green algae and Benson (1958) used it for the determination of phospholipids of plant and animal origin.

The activation of phosphorus on paper chromatograms has been used in the Institute of Biology for determining the purity of trade and laboratory-prepared organic phosphorus preparations. The sensitivity of the activation method of phosphorus determination in solution, when a neutron flux 10^{13} . . n . cm^{-2} . sec^{-1} is used, is about ten times greater that the sensitivity of the colour reaction (Meinke 1955). This makes it possible to detect amounts of phosphorus which are indistinguishable by chemical methods. During the analysis of phosphates in living biological material the rapid incorporation of P^{32} and C^{14} into phosphates in vivo can be utilized, but this is more difficult to apply in the case of analysis of phosphate preparations.

In the experiments under consideration 0·1 μg P/cm^2 appeared, after nine-hour irradiation of the paper with the neutron flux 10^{12} . n . cm^{-2} . sec^{-1}, as a clear spot on a Foma Röntgen-X film. Activation was carried out in the nuclear reactor of the Nuclear Research Institute of the Czechoslovak Academy of Sciences. Before the papers were inserted into polyethylene cases in which they were exposed to the neutron flux, they were isolated from each other by cellophane envelopes to prevent mutual contamination. They were placed on the film several days after irradiation had taken place, by which time the activity of isotopes with a short half-value period had been considerably reduced. Exposure lasted for four days.

Calcium and other impurities were removed from the paper by preliminary washing with 1N HCl, 0·5% ethylendiaminetetraacetic acid and distilled water. The thorough washing out of chlorine is important as it produces P^{32} under the influence of thermal neutrons.

Ascent development of chromatograms was used at 3° C in mixtures of t-butanol, picric acid, water (Hanes and Isherwood 1949) and in methanol, ammonia, water (Bandurski and Axelrod 1951). 100 to 500 μg. of phosphoric esters, converted to free acids by Dowex 50, were applied at the starting point. Whatman No. 1 paper was used.

In spite of the fact that this method does not provide means of detecting other components of phosphate preparations, which do not contain atoms with sufficiently large neutron-capture cross sections such as free sugars, it can be applied with advantage in the analysis of particularly expensive phosphates.

Acknowledgment:

The author whishes to express his sincere thanks to Ing. V. Špeťko, Ing. L. David and Ing. M. Čapek of the reactor laboratory of the Nuclear Research Institute, Czechoslovak Academy of Sciences, for their kindness in providing facilities for neutron activation.

References

Bandurski, R. S., Axelrod, B.: The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. — J. biol. Chem. **193** : 405—410, 1951.

Benson, A. A.: Application of the nuclear reactor in biochemical analysis: neutron activation chromatography. — Sec. U.N. int. Conf. on the peaceful Uses of Atomic Energy, A/conf. 15/P 858 U.S.A. 1958.

Fig. 1.

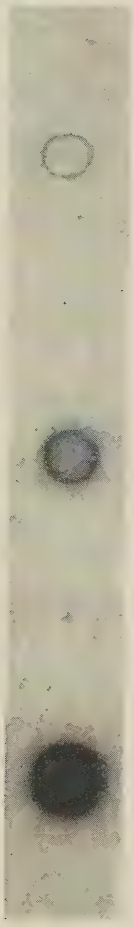
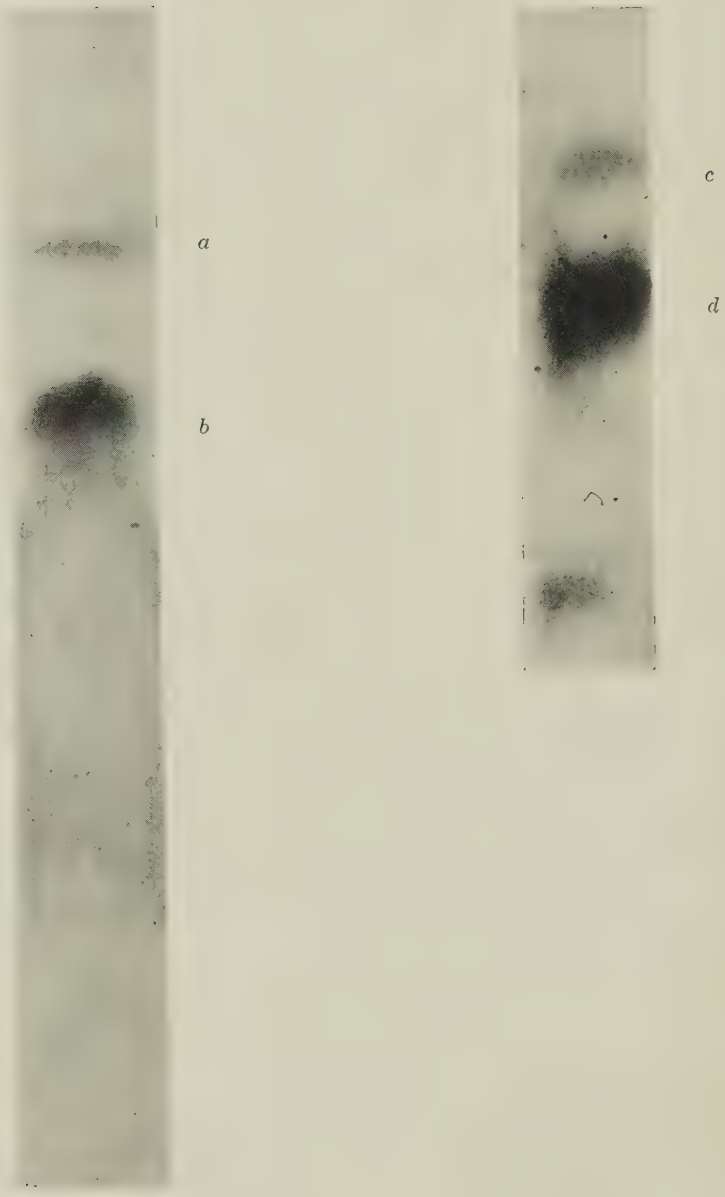


Fig. 2.

1 — Spots of activated inorganic orthophosphate on the paper Whatman No. 1.

2 — Radioautograph of activated chromatogram. a: inorganic orthophosphate; b: glucose-6-phosphate.



Radioautographs of activated chromatograms. a: 3-phosphoglyceric acid.; b: fructosediphosphate; c: inorganic orthophosphate; d: ribose 3-phosphate.

Benson, A. A., Maruo, B.: Radiochemical identification of diglycerophosphate and its probable role in lipid synthesis by plants. — Proc. int. Conf. on Radioisotopes in sci. Research, Paris 1957, paper No. 185.

Brooksbank, W. A., Leddicotte, G. W., Mahlman, H. A.: Analysis for trace impurities by neutron activation. — ORNL-CF-53-10-52, Oct. 23, 1953. (*Cit:* Comar, C. L.: Radioisotopes in biology and agriculture 1955, russian translation Moskva 1957.)

Griffon, H., Barbaud, J.: Utilisation en toxicologie de la radioactivité provoqueé de l'arsenic, pour la détection et l'étude de la répartition de cet élément dans les cheveux. — C. R. Acad. Sci. (Paris) **232** : 1455—1457, 1951.

Hanes, C. S., Isherwood, F. A.: Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. — Nature **164** : 1017—1112, 1949.

Keynes, R. D., Lewis, P. R.: Determination of ionic exchange during nervous activity by activation analysis. — Nature **165** : 809—810, 1950.

Meinke, W. W.: Trace-element sensitivity: comparison of activation analysis with other methods. — Science **121** : 177—184, 1955.

Smales, A. A., Pate, B. D.: The determination of sub-microgram quantities of arsenic by radioactivation III. — Analyst **77** : 196—202, 1952.

Schmeiser, K., Jerchel, D.: Quantitativer Nachweis von Schwefel, Chlor und Brom enthaltenden Verbindungen auf Papierchromatogrammen mit Hilfe induzierter Radioactivität. — Angew. Chem. **65** : 366—368, 1953.

Schmeiser, K., Jerchel, D.: Phosphor-Bestimmung durch Neutronenaktivierung in Papierelektropherogrammen. — Angew. Chem. **65** : 490—491, 1953.

Winteringham, F. P. W., Harrison, A., Bridges, R. C.: Radioactive-tracer techniques in paper chromatography. — Nucleonics **10** : 52—57, 1952.

Address: Jiří Luštinec, Prom. Biol., Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Sciences, Na cvičišti 2, Praha-Dejvice.

BIOL. PLANT. 2 (1) : 67—69, 1960

Использование нейтроновой активационной хроматографии при установлении чистоты фосфатных препаратов

ИРЖИ ЛУШТИНЕЦ
Отделение физиологии растений Биологического института ЧСАН

Резюме

В ядерном реакторе током тепловых нейтронов 10^{12} . н . $см^{-2}$. $сек^{-1}$ в течении девяти часов экспонировались и тем самым были активированы соединения фосфора на бумажной хроматограмме.

Это дает возможность обнаружить 0,1 μгР/$см^2$ и используется при установлении чистоты препаратов фосфорных эфиров.

Метод имеет особое значение для анализа малых количеств дорогих фосфатов.

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

2 (1) : 70—75, 1960

Free Amino Acid Relations in Apple Leaves Before and During the Differentiation of Flower Buds

Josef Sahulka and Alice Sílová

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Sciences, Department of Plant Physiology, Praha

Received June 22, 1959

Souhrn

V minulé době byla v několika pracích zdůrazněna závislost diferenciace květních pupenů u jabloně na metabolismu dusíku. Aby bylo dosaženo dalšího osvětlení metabolických poměrů v období diferenciace a před ním, sledovali autoři poměr volných aminokyselin v listech jabloně odrůdy Ontario. Listy po homogenisaci extrahovali 70% ethanolem, extrakty odsolovali pomocí iontoměniče Dowex 50, aminokyseliny dělili na papíře Whatman č. 1 jednak ve směsi n-butanol-kyselina octová-voda 4 : 1 : 5, jednak ve fenolu syceném borátovým pufrem pH 10 a kvantitativně stanovovali kolorimetricky.

V období, kdy se na plodovém obrostu diferencovaly květní pupeny, došlo téměř k úplnému vymizení argininu z listů. V období před diferenciací přechodně poklesl obsah asparagové kyseliny a přechodně stoupl obsah γ-aminomáselné kyseliny, hrubý poměr volných aminokyselin však byl — kromě argininu — zachován. Nelze zatím rozhodnout, zda zjištěné změny byly ve spojitosti s diferenciací květních pupenů.

Summary

The authors have followed the free amino-acid relations in leaves of the apple variety Ontario, before and during the differentiation of flower buds. At the time when the flower buds were being differentiated on the fruit-spurs, there was found to be an almost complete disappearance of arginine from the leaves. In the period before differentiation there was a temporary drop in the aspartic acid content and a temporary rise in γ-amino-butyric acid content; except for arginine, the over-all proportions of amino acids were preserved. It is not as yet possible to decide whether the above changes have any connection with the differentiation of flower buds.

Introduction

The causes of flower bud differentiation in fruit trees have already been dealt with by a number of authors. Of the several theories advanced, Kleb's theory has been recognised for some time. According to this theory, a high proportion of glycides in relation to mineral elements, and particularly to nitrogen, provides favourable conditions for flower bud differentiation. However, as early as 1920 HOOKER (KOBEL 1954) failed to find any difference in reducing and non-reducing sugar contents in fruit-bearing shoots of apples, in shoots where flower buds were forming and in sterile shoots. POTTER and PHILLIPS in 1930 (KOBEL 1954) also failed to find any connection between content of sugars and formation of flower buds, but he found a definite correspondence between formation of flower buds and the content of non-soluble nitrogen compounds in the fruit spurs of apples. Ursulenko (SPIVAKOVSKY 1951) established that proteinous nitrogen content rises during the period previous to flower bud differentiation, while the content of soluble nitrogen compounds drops. In trees which had flowered abundantly and were forming few flower buds, the content of soluble nitrogen compounds in the fruits purs was greater than in trees which had not flowered and were forming large numbers of flower buds. BIELINYESKA (1956) obtained similar results. In the fruitspurs of apple varieties which fruit in alternate years she found that during the non-bearing years, when large numbers of flower buds were being formed, the greater part of the total nitrogen was in protein form, while in the fruiting years it was in the form of soluble nitrogen compounds.

The work here described has been directed to supplementing these findings by determining whether any shift of amino-acid proportions occurs. Previous work has been almost entirely devoted to the proportions in fruiting shoots. In order to present a complete picture, the leaves of these shoots have also been examined in the present work and the results of analyses are given below.

Material and Methods

Four-year-old dwarf apples, Ontario variety, on MIX stocks were used. They were cultivated in 40-litre wooden vessels containing a mixture of soil and sand in the proportion of 4 : 1. Leaves were gathered from short fruitspurs on which the greater number of flower buds are found. In order to stimulate flower bud formation, all flowers were removed from the trees in the spring. Flower bud differentiation on the fruitspurs took place in the case of the experimental trees from August 6—12. The start of morphological differentiation was ascertained microscopically. Leaves were gathered between 8.30 and 9.30 a.m. in order to eliminate errors due to possible fluctuations of amino-acid content during the day. The leaves from each tree were kept as separate samples; four samples were always taken on one day and were then dealt with independently. The leaves were transferred to the laboratory in glass-stoppered bottles. Each sample was divided into two parts, the smaller of which was used for the determination of dry weight; the larger was frozen, dry weight was determined, after which the sample was homogenized and then extracted. Homogenization was carried out by pounding with sand in a porcelain mortar; 70% ethanol was used for extraction. A green supernatant was obtained after centrifuging and this was kept at —20 °C. The extract was further conserved by the addition of one drop of toluene. Amino acids were determined by paper chromatography. High content of salts, the presence of chlorophyll and various unidentified colouring matters in

the alcoholic extract made it impossible to separate and detect certain of the amino acids. For this reason the alcoholic extracts of amino acids were recleared in the column of the Dowex 50 ion-exchange resin (PLAISTED 1958). Identification of amino acids was carried out on the basis of Rf values obtained from one-dimensional and two-dimensional chromatograms (I n-butanol-acetic acid-water 4 : 1 : 5, II water-saturated phenol), and also on the basis of the specific colour reactions of certain amino acids. Quantitative determination of amino acids was made following separation in one direction on Whatman No. 1 paper using the method described by HEILLMANN, BARROLLIER and WATZKE (1957). Two solvent systems were employed:

(a) n-butanol-acetic acid-water 4 : 1 : 5.

(b) phenol saturated with pH 10 buffer (MCFARREN 1951).

It was necessary to use phenol in order to separate aspartic acid from glutamine. Following separation in the butanol-acetic acid-water system, the glutamine spot merged with the aspartic acid spot, following separation in phenol it merged with the alanine spot. The quantity of glutamine was therefore determined by calculating from the extinction differences and is only approximate. Proline was detected with isatine. After removal of the excess of isatine, the cut-out proline spots were eluted with water-saturated phenol and the colouring was measured colorimetrically (HRABĚTOVÁ and TUPÝ 1959). The products of cystein decomposition were not determined. Phenylalanine was not determined quantitatively, because with the considerable application of the samples required for this determination its spot merged with a spot identical with that of γ-monoethylglutamate. This substance appeared in insignificant amounts during the reclearing of the amino-acid extracts in the ion-exchange resin. Its spots were eluted together with those of glutamic acid during the determination of the latter. The spots of the leucins merge, and were therefore taken together as leucin.

Results and Discussion

The occurrence of the following amino acids and amides was established: aspartic acid, glutamic acid, alanine, arginine, asparagine, glutamine, serin, threonin, γ-aminobutyric acid, valin, phenylalanine, leucin, products of cystein decomposition, proline, glycine traces. Two spots were not identified. MCKEE and URBACH (1953) obtained similar results for variety Granny Smith. BOLLARD (1957) mentions for apple leaves alanine, glutamic acid, aspartic acid, serin and inconsiderable amounts of asparagine and glutamine. The results of the quantitative measurements of amino acids are given in Table 1. For the sake of orientation, measurements made after the period of differentiation are included, although they are not complete. Asparagine has not been included in the table for the following reasons: There is an inconsiderable amount of asparagine in the leaves. In the determination of small quantities serious errors may occur, because asparagine colours very faintly. Proline occurred in amounts less than 3γ to 1 gramme dry weight and it was not, therefore, possible for technical reasons to determine it in comparative samples. According to visual estimate there was not any difference in its amount either between samples taken at one time, or between samples taken at different times before flower bud differentiation. Similarly, on the basis of visual estimate, no difference in cystein decomposition products was found in one-dimensional chromatograms. For rough orientation it may be mentioned that phenylalanine spots were coloured with approximately the same intensity as leucin spots.

In convertion to 1 gramme of dry weight the decrease in the most abundantly represented amino acids is evident (glutamic acid, aspartic acid,

Table 1. Free amino acids in apple leaves

(Quantities in μg. per 1 g. dry weight; values, unless otherwise stated, are averages from four samples)

	5. 6. before differentiation	25. 6.	3. 7.	1. 8.	12. 8.	26. 8.	3. 9.
Arginine	168 ± 3 . 78·16[c])	206 ± 3 . 66·90	50 ± 3 . 7·09	73 ± 3 . 5·98	T	T	T
Serin	114 ± 3 . 14·28	93 ± 3 . 9·00	54 ± 3 . 4·24	62 ± 3 . 4·28	45 ± 3 . 6·48	37 ± 3 . 3·75	42[b])
Glutamic acid	957 ± 3 . 57·86	862 ± 3 . 36·17	519 ± 3 . 37·39	401 ± 3 . 19·82	394 ± 3 . 25·88	279 ± 3 . 12·13	441[b])
Alanine	165 ± 3 . 28·72	154 ± 3 . 15·46	92 ± 3 . 7·89	81 ± 3 . 3·67	100 ± 2 . 26·43	66 ± 3 . 7·55	70[b])
Aspartic acid	781 ± 3 . 100·41	300 ± 3 . 47·38	162 ± 3 . 34·47	251 ± 3 . 20·65	226 ± 3 . 35·51	154 ± 3 . 5·82	259[b])
Glutamine	183	104	33	N	57	34	61[b])
Threonin	69[a])	34 ± 3 . 3·60[c])	24 ± 3 . 2·44	29[a])	23[b])	N	N
γ-aminobutyric acid	14 ± 3 . 5·01[c])	53 ± 3 . 4·36[c])	39 ± 3 . 3·51	11 ± 3 . 2·28	21[b])	N	10[b])
Valin	20 ± 3 . 2·64[c])	21 ± 3 . 0·00[c])	16 ± 3 . 4·55	10 ± 3 . 2·61	15[b])	N	11[b])
Leucin	21 ± 3 . 6·09[c])	33 ± 3 . 3·01[c])	29 ± 3 . 6·74	13 ± 3 . 1·61	16[b])	N	19[b])

Notes: T = traces
N = not determined
a) = value obtained from analysis of one sample
b) = average from two samples
c) = average from three samples

Flower bud differentiation took place from 6—12 August.

alanine, arginine, serin). The most marked decrease is in the case of arginine. No decrease was found for valin and leucin. Unfortunately, changes in the proportion of amino acids to total nitrogen were not established. In the case of aspartic acid there was a marked drop in concentration during the period previous to flower bud differentiation, and a rise again after this period. In the case of aminobutyric acid the reverse occurred.

Table 2 shows the percentual representation of the quantitatively measured amino acids. For completeness one more measurement from the period following flower bud differentiation is given. The relative representation of amino acids changes mainly under the influence of arginine. The most abundant amino acids are always glutamic acid and aspartic acid; valin, leucin, γ-aminobutyric acid and threonin are represented to a relatively small extent through out the period under consideration. Aspartic acid remains throughout the second most abundant amino acid, in spite of the temporary drop during the period previous to flower bud differentiation. At about the time of flower bud differentiation, arginine almost entirely disappeared from the leaves. SCHNEIDER (1958) noted a similar phenomenon in peach trees during the summer. According to the reports of OLAND, and

Table 2. Percentual representation of free amino acids in apple leaves

	5. 6.	25. 6.	3. 7.	1. 8.	12. 8.	3. 9.
Arginine	7·4	11·7	5·1	7·7	T	T
Serin	4·9	5·3	5·5	6·7	5·4	4·9
Glutamic acid	41·3	49·1	52·6	43·2	46·8	51·8
Alanine	7·1	8·8	9·3	8·7	11·9	8·2
Aspartic acid	33·7	17·1	16·4	27·0	26·9	30·4
Threonin	3·0	1·9	2·5	3·1	2·7	N
δ-aminobutyric acid	0·6	3·0	4·0	1·2	2·5	1·2
Valin	0·9	1·2	1·6	1·1	1·8	1·3
Leucin	0·9	1·9	3·0	1·4	1·9	2·2
	99·8	100·0	100·0	100·1	99·9	100·0

Note: T = traces
N = not determined
The values in this table have been obtained by conversion of those in Table 1.
The sum of amounts of amino acids was taken as 100; glutamine was excluded.

Yemm (1956) and Reuter (1957), free arginine occurs in considerable quantities in apple branches and is considered as a reserve nitrogen compound. On the other hand, a number of authors have found accumulation of arginine in cases of deficit in certain nutrient elements and decrease in its content when the deficit was made good. Thus, Pleshkov, Ivanko and Antonova (1957) found arginine accumulation in the presence of potassium deficiency. Coleman (1957), Mertz and Matsumoto (1956) noted increased arginine concentration in the presence of sulphur deficiency. Gleiter and Parker (1957) discovered a greater arginine content with phosphorus deficiency. Holley and Cain (1955) ascertained arginine accumulation in chlorotic plants growing under conditions of iron deficiency. Hewitt, Jones and Williams (1949) report arginine accumulation in cases of manganese deficiency. Judging by the appearance of the plants and the sizes of nutrient doses it can, however, be assumed that the experimental plants were not suffering from deficiency of any nutrient, and thus the decrease in arginine could not have been caused by the remedying of any abnormal conditions. It is not possible to decide on the basis of the present work whether the decrease in arginine content in the leaves has any relation to flower bud differentiation.

References

Bielinyeska, M.: Chemical investigations on biennial bearing of apple trees. — Bull. de L'Acad. polonaise des Sciences, Cl. II. — **4** : 179—181, 1956.

Bollard, E. G.: Composition of the nitrogen fraction of apple tracheal sap. — Austral. J. Biol. Sci. **10** : 279—287, 1957.

Coleman, R. G.: The effect of sulphur deficiency on the free amino acids of some plants. — Austral. J. Biol. Sci. **10** : 50—56, 1957.

McFarren, E. F.: Buffered filter paper chromatography of the amino acids. — Anal. Chem. **23** : 168—174, 1951.
Gleiter, M. E., Parker, H. E.: The effect of phosphorus deficiency on the free amino acids of alfalfa. — Arch. Biochem. and Biophys. **71** : 430—436, 1957.
Heilmann, J., Barrollier, J., Watzke, E.: Beitrag zur Aminosäurebestimmung auf Papierchromatogrammen. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **309** : 219—220, 1957.
Hewitt, E. J., Jones, E. W., Williams, A. H.: Relation of molybdenum and manganese to the free amino-acid content of the cauliflower. — Nature **163** : 681, 1949.
Holley, R. W., Cain, J. C.: Accumulation of arginine in plants afflicted with iron-deficiency type chlorosis. — Science **121** : 172—173, 1955.
Hrabětová, E., Tupý, J.: Quantitative determination of proline by paper chromatography. — In press.
McKee, H. S., Urbach, G. E.: The physiology of growth in apple fruits. V. Soluble nitrogen constituents. — Austral. J. Biol. Sci. **6** : 369—378, 1953.
Kobel, F.: Lehrbuch des Obstbaus auf physiologischer Grundlage. Berlin 1954.
Mertz, E. T., Matsumoto, H.: Further studies on the amino acids and proteins of sulphur-deficient alfalfa. — Arch. Biochem. and Biophys. **63** : 50—63, 1956.
Oland, K., Yemm, E. W.: Nitrogenous reserves of apple trees. — Nature **178** : 219, 1956.
Plaisted, P. H.: Clearing free amino acid solutions of plant extracts for paper chromatography.— Contr. Boyce Thompson Inst. **19** : 231—244, 1958.
Pleshkov, B. P., Ivankov, Sch., Antonova, G. V.: Vliyanie uslovy pitaniya na soderzhaniye svobodnykh aminokislot v listyakh fasoli. (The influence of nutritive conditions on free amino-acid content in bean leaves) — Dokl. AN SSSR **117** : 1070—1073, 1957.
Reuter, G.: Die Hauptformen des löslichen Stickstoffs in vegetativen pflanzlichen Speicherorganen und ihre systematische Bewertbarkeit. — Flora **145** : 326—338, 1957.
Schneider, M. A.: Les variations annuelles des acides aminées du Pêcher. — Comptes rendus hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences **247** : 1034—1037, 1958.
Spivakovsky, N. D.: Udobrenie plodovykh i yagodnykh kultur. (Manuring of fruit and berry crops.) — Moskva, 1951.

BIOL. PLANT. 2 (1) : 70—75, 1960

Свободные аминокислоты листьев яблони в период дифференциации цветочных почек и до него

И. Сагулка, А. Силова

Отделение физиологии растений Биологического института ЧСАН, Прага

Резюме

Авторы изучали свободные аминокислоты листьев яблони сорта Онтарио (Ontario) в период до дифференциации цветовых почек и в период их дифференциации. В период дифференциации почек из листьев почти полностью исчезает аргинин. В период до дифференциации временно снижалось содержание аспарагиновой кислоты и временно повышалось содержание γ-аминомасляной кислоты, однако, общее отношение свободных аминокислот, за исключением аргинина, оставалось то же. Нельзя пока решить, имеют ли установленные изменения связь с дифференциацией цветочных почек.

BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA)

2 (1) : 76—78, 1960

BRIEF COMMUNICATION

Determination of Water Deficit in Disks Cut out from Leaf Blades

JIŘÍ ČATSKÝ

Department of Plant Physiology, Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha

Received August 10, 1959

Souhrn: Autor popisuje metodu stanovení vodního deficitu v terčících, vyseknutých z listů. Terčíky o průměru 8 mm se sytí položeny na polyetylenových kroužcích v otvorech v plotně z polyuretanové pěny, nasycené vodou (obr. 1, foto 1 a 2). Toto uspořádání umožňuje dokonalé nasycení pletiva během 3 hod. za minimální možnosti infiltrace.

Summary: The author describes a method for the determination of water deficit in disks punched out of leaves. The disks, 8 mm. in diameter, are placed on polyethylene rings and saturated in the apertures of a polyurethane foam plate which has been saturated with water (fig. 1, photo 1 and 2). This arrangement makes it possible for the tissue to be completely saturated in 3 hours with a minimum opportunity for infiltration.

The aim of the work here described was to work out a method for the rapid determination of water deficit, which, while requiring little space, provides reliable results.

In view of the strong influence of growth on the determination of water deficit in young leaves (ČATSKÝ 1959), an attempt was made in the present work to reduce to the utmost the time required for satisfactory saturation of the tissues. Rapid saturation was achieved by using disks cut out of leaf blades and saturated through the cut edges. On the basis of work already published it was safe to assume that under suitable conditions the vital processes continue in excised disks for a certain time in practically the same manner as in the plant *in situ*. A very clear indication of the correctness of this assumption has been most recently provided by BARTOŠ, KUBÍN, and ŠETLÍK (1960) using leaf disks for the determination of photosynthesis intensity. It is the opinion of the present author that the determination of water deficit in disks of predominantly assimilatory tissue is more reliable than the determination in whole leaves since the harmful effect of water deficit on the plant consists to a large extent in the inhibition of photosynthesis.

WEATHERLEY (1950) successfully determined water deficit using 10 mm. disks floating on water. This method of saturation is not, however, suitable for normal work because infiltration and drying of the cut surface may take place. It also involves technical difficulties. In view of the fact that saturation "took place only at the cut edges of the disks" (WEATHERLEY 1947), it was decided, on the basis of the work by BARTOŠ, KUBÍN and ŠETLÍK (1960), to carry out saturation in the apertures of a polyurethane foam plate, which had been saturated with water. This plate was used in place of the agar plate employed in earlier work (ČATSKÝ 1959), because of its greater durability. The disks to be saturated are placed on polyethylene rings in such

a way as to ensure that their edges (cut surfaces) touched the walls of the apertures in the polyurethane plate. A thin layer of water is formed between the cut edges of the disks and the walls of the apertures, thus ensuring complete saturation of the tissue with the minimum risk of infiltration. Further explanation of the method is provided by Fig. 1 and the photographs.

Naturally, the smaller the diameter of the disks, the more rapid the process of saturation (cf. WEATHERLEY 1947). A diameter of 8 mm. was chosen after testing five sizes 3, 5, 8, 12 and 16 mm.), because this was found to be most suitable from the point of view of sufficiently rapid saturation without infiltration, of convenience in manipulation and accuracy in weighing. The apertures in the polyurethane plate measured 7 mm., ensuring close contact between the disks and the plate. Under the conditions described and at laboratory temperatures, complete saturation of the tissues was obtained, even with large deficits, quite reliably after 3 hours. The saturation curve is similar to that obtained by ČATSKÝ (1959), fig. 7.

The determination of water deficit is carried out in practice as follows: a sharp cork-borer or punch is used to punch out disks of 8 mm. in diameter from the experimental leaf (for the description of a suitable punch see BARTOŠ et al. 1960). Five to ten such disks are weighed together to the nearest 0·1 mg. and are then saturated individually in the apertures of the polyurethane plate for 3 hours. Following saturation they are carefully dried between filter papers, weighed once more all together and their dry weight is determined. The numerical expression of water deficit is given according to STOCKER's (1929) method.

For the determination of water deficit in small areas of tissue even single disks can be used; in this case, however, the accuracy of the results is somewhat reduced owing to less precise weighing. The method here described gives results of 1—2% higher than the actual values (graph 1), owing to the fact that isolated disks can be saturated to a higher degree.

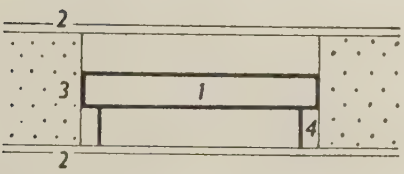


Fig. 1. Saturation of disks. 1 . . . disk, 2 . . . damp filter paper, 3 . . . polyurethane plate, 4 . . . polyethylene ring (cut from piping).

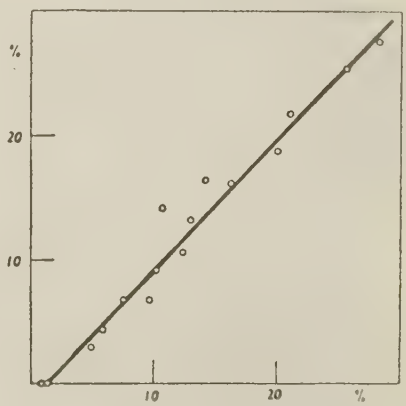


Fig. 2. Relation between the value for deficit obtained by artificial wilting of leaf tissue (ordinate) and that determined by the disk method (abscissa). Experimental procedure: Mature leaves were taken from 120-day-old plants of *Nicotiana Sanderae* hort. (*N. Forgetiana* hort. ex HEMSLEY × *N. alata* LINK et OTTO), which had been cultivated in an unheated glasshouse (April-July) and had rosettes of 11 leaves. The experimental leaves were saturated by STOCKER's method (1929) for 48 hours. Rectangles of leaf tissue were excised and left to wilt on a silon net until the required deficit was reached. The deficit of this tissue was then determined by the disk method (7 disks). The variation in values is not only due to inaccuracy in measurement, but also to a great extent to heterogeneity of the leaves (SLAVÍK 1959).

References

Bartoš, J., Kubín, Š., Šetlík, I.: Dry weight increase of leaf disks as a measure of photosynthesis. — Manuscript prepared for Biol. Plant. **2**, 1960.

Čatský, J.: The role played by growth in the determination of water deficit in plants. — Biol. Plant. **1** : 277—286, 1959.

Slavík, B.: Water relations within the area of one leaf blade. — Proc. 9th int. bot. Congr. (Montreal), vol. **2** : 367, 1959.

Stocker, O.: Das Wasserdefizit von Gefässpflanzen in verschiedenen Klimazonen. — Planta **7** : 382—387, 1929.

Weatherley, P. E.: Note on the diurnal fluctuations in water content of floating leaf disks. — New Phytol. **46** : 276—278, 1947.

Weatherley, P. E.: Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. — New Phytol. **49** : 81—97, 1950.

Address: Jiří Čatský, Prom. Biol., Biologický ústav ČSAV, Praha-Dejvice, Na cvičišti 2.

BIOL. PLANT. 2 (1) : 76—78, 1960

Определение водного дефицита в дисках листовой ткани

И. Чатскы

Отделение физиологии растений Биологического института ЧСАН, Прага

Резюме. Автором описывается метод определения водного дефицита в дисках, высеченных из листьев. Диски диаметром 8 мм насыщаются после их установления на полиэтиленовые кольца в отверстиях в плите из полиуретановой пены, насыщенной водой (рис. 1, фот. 1 и 2). Данная схема позволяет полное насыщение ткани в течении 3 часов при минимальной возможности инфильтрации.

BIOLOGIA PLANTARUM — Издается Биологическим институтом Чехословацкой Академии Наук в Издательстве ЧСАН, Прага II., Водичкова 40. — Выходит 4 раза в год. Подписная цена на 1 год Кчс 30,—, Руб 12,80, $3.20, £1 2/10; цена одного номера Кчс 7,50. — Адрес редакции: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha 6. Заказы: Artia, Smečky 30, Praha 2, Československo. — Типография: Knihtisk, n. p. závod 4, Praha 13, Sámova 12.

Issued by Institute of Biology of the Czechoslovak Academy of Sciences in the Publishing House ČSAV Praha II, Vodičkova 40. Yearly subscription (4 numbers) Kčs 30,—. Rbl 12,80, $3.20, £1 2/10. Single number Kčs 7,50. — Address: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha 6. Orders: Artia, Smečky 30, Praha 2, Czechoslovakia.

Zájemcům v ČSR dodá Poštovní novinový úřad, Jindřišská 14, Praha 3.

© by Nakladatelství Československé akademie věd 1960.

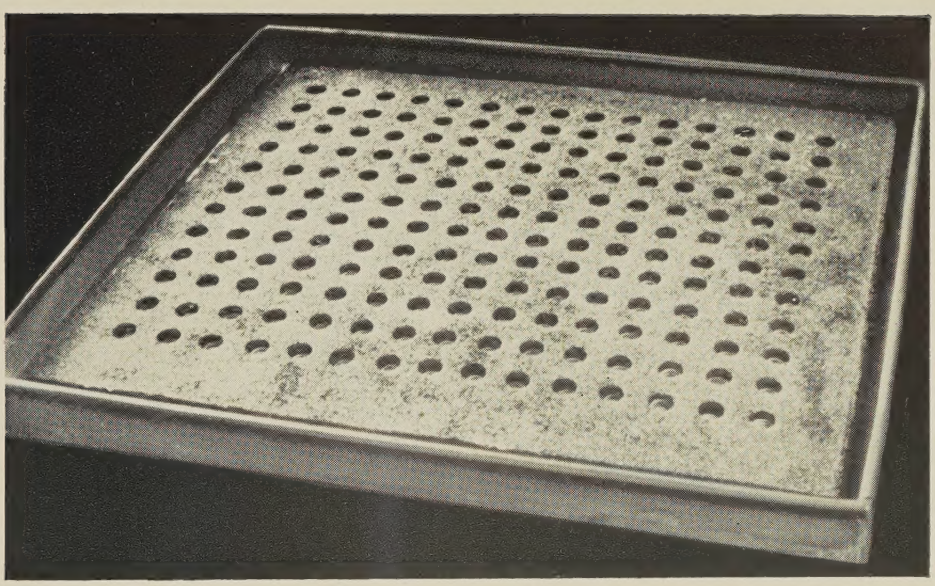


Photo. 1. Polyurethane foam plate with apertures for saturation of disks.

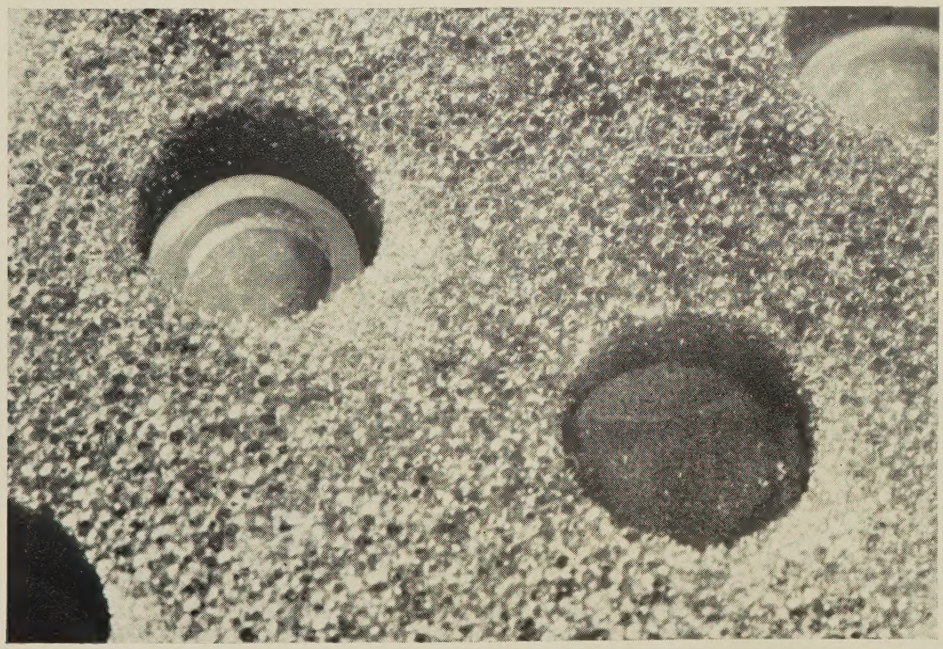


Photo. 2. Apertures in polyurethane plate (disk in position on right).

biologia plantarum

Časopis pro experimentální botaniku
Journal for Experimental Botany
Журнал экспериментальной ботаники
Zeitschrift für experimentelle Botanik

BIOLOGIA PLANTARUM (Journal for Experimental Botany) publishes original scientific papers and brief communications from the fields of plant physiology, experimental ecology, genetics, cytology, experimental morphology, biochemistry and pathology. Articles are published in the most important languages. The author bears the full responsibility for the originality of the paper submitted. Only such contributions will be accepted which contain original results not submitted for publication elsewhere. All contributions are subject to a consideration by the referees and by the Editorial board. The author must give serious consideration to the referees' comments.

The original copy and the first carbon copy along with original illustrations and tables should be sent to Dr. Bohdan Slavík, Biologický ústav ČSAV, Praha 6, Na cvičišti 2, Czechoslovakia. Papers should be in double-spaced typing throughout, i. e. including footnotes, figure legends, tables and references. Each table, figure legends and references should be typed on a separate sheet of paper. The length of a paper should not exceed 10 printed pages, including figures, tables and references, one printed page being approximately equal to two double-spaced typewritten ones (foolscap size). In aranging the manuscript and the references attention should be paid to the usage of recent editions of Biologia plantarum. A summary in Czech, written as a self-contained abstract (objective of the work, short account of methods and material, results and conclusions) will precede the text of each paper. The length of the abstract should never exceed 20 type-written lines. Its text will also be sent by the editors to foreign abstracting journals. Foreign authors shall submit the abstract in the language of the paper.

Each paper should be introduced by a concise Summary, including an account of new findings. This summary, including its translation placed at the end of the paper, should not exceed 60 type-written lines. The following Introduction should be quite brief and include the presentation of the problem to be investigated. Only those papers may be quoted which are in direct contact with the submitted contribution, not those of historical interest only. Latin names and names of persons should not be specially marked by the author in the manuscript. If the author has any suggestions as to the size or species of type (garmond, petit etc.) he should make a note on the margin of the sheet. The final decision shall be made by the editors.

Tables must be arranged and described in such a way that they be comprehensible without referring to the text. Each table should bear a number and a title.

Diagrams should be in Indian ink and drawn on Bristol board or tracing cloth, surrounded by a frame and should have the following sizes: length of the base 12 cm., diameter of experimental points 3 mm., or length of the base 18 cm., diameter of points 4 mm. The text should only be given in pencil. Figure captions and legends should be typed separately.

Photographs should be printed on glossy paper and should be in sharp focus with good contrast. The author's name, the figure number and the top of the figure should be indicated on the reverse side of all illustrations.

References in text should contain author's name followed by the year of publication, e. g. Björn and Virgin (1958), or (Björn and Virgin 1958). References at the end of the paper should be arranged alphabetically as follows:

Björn, L. O., Virgin, H. I.: The influence of red light on the growth of pea seedlings. An attempt to localize the perception. — Physiol. Plant. **11** : 363—373, 1958.

Quotations of papers originally printed in Russian alphabet or any other non-Latin alphabet should be left for transliteration into English or German to the editors. The author's name, the journal and the title of the paper shall appear in the corresponding transliteration and a translation of the title shall be attached. If the original paper has already a foreign-language summary, the author is requested to give its title. E. g.:

Znamensky, I. E.: Fiziologicheskaya i biokhimicheskaya kharakteristika kserofitov. (Physiological and biochemical characteristics of xerophytes.) — Eksper. Botanika **6** : 93—146, 1948.

Similarly, quotations of papers published in less common languages shall be provided with a translation of the paper title in addition to the original.

Following the list of references, the author's full present address should appear.

The author receives one or two proofs of his paper. The manuscript is held to represent the final text of the paper, the proofs serving only to correct typographical errors. The proofs must be returned within two days, otherwise the author's corrections cannot be considered.

The author may obtain 70 reprints without charge.

INDEX

J. Nečas: The Heritability of the Amylolytic Activity in Barley 1
A. Ginterová: Content of Different Forms of Vitamin C in Potatoes Treated with Ethylene Chlorhydrin 19
Й. Клоз: Количественная оценка серологических реакций при помощи измерения помутнения в сравнительной серологии растений 27
Z. Šesták, J. Ullmann: The Effect of Gibberellic Acid on the Dynamics of Chlorophyll Synthesis in Etiolated Seedlings 43
R. Dostál: Über die Wechselwirkung der Gibberellinsäure und anderer Stimulatoren in den Wachstumskorrelationen 48
R. M. Datta, S. K. Dana: Interspecific Hybridization Between *Corchoris olitorius* Linn. (Strain C. G.) and *C. sidoides* F. Muell. and *C. Capsularis* Linn. (Strain D 154) and *C. sidoides* Muell. 61
J. Luštinec: The Application of Neutron Activation Chromatography to the Determination of the Purity of Phosphate Preparations 67
J. Sahulka, A. Stlová: Free Amino Acid Relations in Apple Leaves Before and During the Differentitation of Flower Buds 70

Brief Communication:

J. Čatský: Determination of Water Deficit in Disks Cut out from Leaf Blades 76

The following papers are being prepared for the next issue:

Ž. Stojanov: Über die Bodenfeuchtigkeit bei der die Pflanzen absterben
J. Řeřábek: Humic Acid Interaction in the Growth Process
Л. Хвойка: Транспорт радиофосфора из корней в крону корнесобственных и окулированных деревьев
Й. Чатскы, Б. Славик: Полевой прибор для определения интенсивности фотосинтеза
E. Daumann: Über die Bestäubungsökologie der Parnassia-Blüte
J. Kloz, V. Turková, E. Klozová: Serological Investigacion of Taxonic Specificity of Proteins in Various Plant Organs in Some Taxons of the Family *Viciaceae*
M. Šmídová: The Influence of Humus Acids on the Respiration of Plant Roots
K. B. Deshpande: Studies on Pectolytic Enzyme System of *Rhizoctonia solani* Kuhn
J. Tupý: Sugar Absorption, Callose Formation and the Rate of Pollen Tubes Growth
Z. Polák: The Effect of Two Mucoproteins on Infection by Tobacco Mosaic Virus
G. Staar: Zur Problematik der endogenen Virusbildung

Kurze Mitteilung:

A. Činčerová: Aufklatschchromatographie der Zucker durch Humussäure beeinflusster Weizenpflanzen